SÉRIE A, N° 2573
N° D'ORDRE 3445

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Bernard MAUPIN

1re THÈSE

RECHERCHES HISTOCHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR LES PLAQUETTES SANGUINES DE L'HOMME

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 26 Juin 1953 devant la Commission d'examen

MM. **LAUGIER** *Président*
AUBEL } *Examinateurs*
Mlle **Le BRETON**

1953

IMPRIMERIE J. & R. SENNAC
54, rue du Faubourg Montmartre
PARIS (9e)

SÉRIE A. N° 2573
N° D'ORDRE 3445

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Bernard MAUPIN

1re THÈSE

RECHERCHES HISTOCHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES SUR LES PLAQUETTES SANGUINES DE L'HOMME

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 26 Juin 1953 devant la Commission d'examen

MM. **LAUGIER** *Président*
AUBEL } *Examinateurs*
Mlle **Le BRETON** }

1953

IMPRIMERIE J. & R. SENNAC
54, rue du Faubourg Montmartre
PARIS (9e)

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... M. A. CHATELET.

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions
L. LUTAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique
Robert LEVY	T	Physiologie comparée
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale
De BROGLIE	T	Théories physiques
JOB	T	Chimie générale
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
COMBES	T	Physiologie végétale
GARNIER	T	Géométrie supérieure
PERES	T	Mécanique des fluides et applications
LAUGIER	T	Physiologie générale
TOUSSAINT	T	Technique Aéronautique
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.)
G. RIBAUD	T	Hautes températures
CHAZY	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste
CROZE	T	Physique théorique et physique céleste
DUPONT	T	Théories chimiques
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral
BARRABE	T	Géologie structurale et géologie appliquée
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique
Jacques BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique
AUBEL	T	Chimie biologique
Mme JOLIOT-CURIE	T	Physique générale et Radioactivité
PLANTEFOL	T	Botanique
CABANNES	T	Recherches physiques
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité
MONNIER		Physiologie générale
PIVETEAU	T	Géologie
ROCARD	T	Physique
H. CARTAN	T	Mathématiques (E. N. Supérieure)
SCHAEFFER	T	Physiologie des fonctions
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Mécanique générale
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.)
CHRETIEN	T	Chimie minérale
P. DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique
CHATELET	T	Arithmétique et théorie des nombres
EPHRUSSI	T	Génétique
WURMSER	T	Biologie physico-chimique
BAUER	T	Chimie - Physique
RIVIERE		Géologie (P.C.B.)
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.)
LUCAS	T	Physique
A. THOMAS	T	Evolution des êtres organisés
ARNULF		Optique appliquée
Max MORAND		Physique
SOLEILLET		Physique
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DANJON	T	Astronomie
FROMAGEOT	T	Chimie biologique
LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité
JANET	T	Mathématiques générales
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Biologie animale (P.C.B.)
EICHHORN		Biologie végétale (P.C.B.)
DE CUGNAC		Biologie végétale (P.C.B.)
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie - Physique
THELLIER		Physique du Globe
AUDUBERT		Electrochimie
L'HERITIER		Génétique
GRIVET	T	Radio Electricité
PONCIN		Mécanique des fluides
THIRY	T	Mécanique appliquée
DUBREIL		Mathématiques générales
QUELET		Chimie (P.C.B.)
CAGNIARD		Géophysique appliquée
CHAMPETIER		Chimie appliquée
CUVILLIER		Géologie structurale et Géologie appliquée
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT		Physique (P.C.B.)
WIEMANN		Chimie (P.C.B.)
JACQUINOT	T	Physique (P.C.B.)
VASSY		Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES		Théories physiques
M. PRUVOST	T	Géologie
AMIEL		Chimie (P.C.B.)
HOCART		Minéralogie
MACHEBŒUF		Microbiologie
J.-P. MATHIEU		Physique (P.C.B.)
COUTEAUX		Biologie animale (P.C.B.)
MAY		Biologie animale (P.C.B.)
CHOQUET		Calcul différentiel
FELDMANN		Biologie (P.C.B.)
GUINIER		Physique (P.C.B.)
JOST		Biologie (P.C.B.)

R. WHY BIBLIOTHEEK LEIDEN

Secrétaire ..... Ch. MONIER

RECHERCHES HISTOCHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

SUR LES PLAQUETTES SANGUINES DE L'HOMME

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

AVANT - PROPOS

Les plaquettes sanguines (appelées encore "globulins" ou "thrombocytes" (note 1) sont les plus petits des éléments figurés du sang des Mammifères. Ce sont aussi les plus mal connus.

Depuis leur découverte par DONNE en 1842, d'innombrables travaux leur ont été consacrés. Nous exposerons rapidement les faits essentiels qui ont permis de leur attribuer une place à part, tant au point de vue morphologique qu'au point de vue physiologique.

Nous examinerons ensuite quelques points controversés, dont l'étude fera plus précisément l'objet de nos recherches.

A) - FAITS CONNUS :

Les plaquettes s'observent principalement dans le sang circulant, où leur nombre, chez l'homme normal, est de l'ordre de 300.000 par millimètre cube. On les observe également dans de nombreux organes, dans la moelle osseuse où elles prennent naissance, dans la rate où s'opère leur destruction.

Autonomie des plaquettes : Dans le sang humain, les plaquettes se distinguent des autres éléments figurés :

- par leurs dimensions et leur aspect morphologique ;
- par leur faible densité ;
- par leurs propriétés physiologiques élémentaires (adhésivité, agglutinabilité) ;
- par leurs caractères antigéniques spécifiques (bien que les plaquettes soient de "mauvais antigènes", il est possible de préparer des sérums strictement anti-plaquettaires, distincts des sérums hémolytiques et des sérums anti-leucocytaires) ;
- par leur filiation à partir du mégacaryocyte (selon l'hypothèse classique de WRIGHT).

D'autres arguments peuvent être avancés, que nous reprendrons dans la suite de ce travail : les particularités rapportées ci-dessus plaident déjà suffisamment en faveur de l'autonomie des plaquettes.

Note 1 : "Blood Platelets" pour les auteurs anglo-saxons, "Blutplättchen" ou "Thrombozyten" pour les allemands, "Piastrine" pour les italiens. Le terme d' "Hématoblastes" a pratiquement disparu du vocabulaire.

Origine, vie et mort des plaquettes :

Les plaquettes prennent naissance dans la moelle osseuse, aux dépens des mégacaryocytes, selon l'opinion très généralement admise : "Les géants de la moelle osseuse engendrent les nains du sang" (E.FRANCK).

Aucune mitose n'est décelable, non plus qu'aucun accroissement de substance : les plaquettes jeunes de la moelle osseuse présentent d'emblée l'aspect qui leur est connu dans le sang circulant, où leur vie se limite à 4 ou 5 jours, selon les estimations les plus récentes.

Leur destruction s'opere principalement dans la rate.

Morphologie descriptive :

A l'état frais, les plaquettes se présentent sous l'aspect de petits corpuscules fortement réfringents, de forme arrondie, sphérique ou ovalaire, dont le grand diamètre atteint 2 à 3 microns.

L'examen sur fond noir (FONIO et ses éleves, 1942, 35) (FERRY, 1948) ou en contraste de phase (WERNER) (FEISSLY & LUDIN, 1949,32) (BESSIS & BRICKA, 1953, 5) (cf. figure 1) fait apparaître des granules centraux immobiles, se détachant sur un fond transparent. La lyse des plaquettes entraîne la dispersion de ces granules réfringents dans le milieu environnant (cf. fig.2).

L'observation cinématographique (BESSIS & BRICKA) au rythme d'une image toutes les 3 secondes, montre en outre une certaine mobilité des plaquettes, avec émission de fines expansions dendritiques, et l'existence d'une vacuole contractile.

Apres étalement et fixation, les plaquettes présentent des formes extrêmement variées selon les conditions de récolte, les milieux et les surfaces au contact. Aussi la classification des plaquettes d'apres leur morphologie, comme il a été maintes fois proposé (ARNETH, TZANCK & DREYFUSS, FONIO) apparait-elle dénuée d'intérêt réel, bien que les différences d'aspect correspondent, dans l'esprit des auteurs de "formules plaquettaires", à des aptitudes physiologiques différentes.

Il est généralement admis que la forme arrondie est celle des plaquettes circulantes (forme circulante), que les plaquettes sorties des vaisseaux se hérissent aussitôt de fins prolongements (forme dendritique ou forme d'irritation), puis s'étalent au contact des surfaces mouillables (forme étalée ou forme de repos), en passant par une forme intermédiaire ou forme de transition, où les prolongements se retirent tandis que les granulations se rassemblent au centre.

La structure des plaquettes est facilement mise en évidence par les colorations panoptiques, classiques en hématologie (et notamment celle de MAY-GRUNWALD-GIEMSA) qui opposent nettement :

- le hyalomère, ou zone claire, faiblement colorée dans les conditions habituelles,

- et le chromomère ou granulomère, formé de fins granules uniformément répartis. L'aspect de granules grossiers, rassemblés au centre en un pseudo-noyau, est lié à l'évolution des plaquettes dans le sang extravasé. Ces granules, de teinte rouge foncé, tranchent le plus souvent sur le fond clair du hyalomère. Seule une coloration très poussée fournit une teinte uniforme rouge violacé.

Ce piqueté rouge carminé, sur fond rose pâle, est caractéristique des plaquettes sanguines. Un aspect analogue, mais plus diffus, est présenté par le cytoplasme des mégacaryocytes de la moelle osseuse.

Examinées au microscope électronique (WOLPERS & RUSKA, 1939 - BESSIS et coll. 1949 - BRAUNSTEINER, 1951 - FEBVRE, 1951, 31) les plaquettes présentent une ultra-structure fibrillaire du hyaloplasme; les fibrilles étant elles-mêmes composées de très fins granules (fig 3 - 4). La partie centrale est opaque aux électrons, mais certains clichés particulièrement démonstratifs (fig.5) indiquent que le pseudo-noyau des plaquettes se résout en granules.

Morphologie comparée :

Comme les hématies, les plaquettes se présentent sans noyau apparent dans la seule classe des Mammifères. Elles existent dans le sang de tous les Mammifères normaux, y compris les Monotrèmes (HITTWAIR). Elles ne se distinguent guère, morphologiquement et fonctionnellement, de celles de l'homme. Les conclusions formulées à propos d'une espèce donnée paraissent applicables aux plaquettes de l'ensemble des Mammifères.

Chez les autres Vertébrés existent des cellules fusiformes, ou "Spindelzellen" (appelées encore thrombocytes ou thromboblastes), éléments nucléés à cytoplasme incolore, qui semblent jouer dans la coagulation le même rôle que les plaquettes chez les Mammifères (HAYEM). JOLLY préfère le terme de "corps fusiformes", qui ne préjuge pas leur rôle physiologique. Leur aspect varie sensiblement suivant les classes considérées : ovales chez les Oiseaux, irrégulières et volumineuses chez les Poissons et surtout chez les Batraciens, étirées en longueur chez les Reptiles, les cellules fusiformes ont pour caractères communs un noyau fortement colorable, d'allure pycnotique et sans nucléole, un cytoplasme peu abondant, surtout localisé aux pôles. Elles ne présentent ni motilité propre, ni activité phagocytaire.

La présence d'un noyau dans les thrombocytes des Vertébrés inférieurs est un fait remarquable, qui nous incitera précisément à rechercher les acides nucléiques dans les plaquettes du sang humain, dépourvues de noyau apparent.

La parenté antigénique de ces thromboblastes avec les plaquettes des Mammifères a été soulignée par ROSENTHAL & FALKENHEIM - LEDINGHAM (1916), GRUNBAUM (1928) qui ont noté une identité de structure sérologique : un sérum anti-thromboblastique produit chez les Oiseaux un purpura comparable à celui que provoque le sérum anti-plaquettaire chez les Mammifères.

D'autres auteurs, et notamment WRIGHT (1910), admettent que les thromboblastes des Oiseaux et les mégacaryocytes des Mammiferes sont, au point de vue de leur structure et de leur génétique, les homologues d'une seule et même cellule qui circulait dans le sang des Vertébrés disparus. Quoiqu'il en soit de cette hypothese, il est intéressant de relever le parallélisme entre les érythrocytes et les thrombocytes, sans noyau apparent chez les Mammiferes, nucléés dans le sang des autres Vertébrés.

Des corps hyalins identiques aux plaquettes par leur morphologie, leur fragilité et leur pouvoir d'agglutination, ont été mis en évidence dans le sang de l'Ecrevisse (Astacus fluviatilis). De même NOTKIN a décrit des "cellules explosives" chez les Crustacés.

Finalement, des éléments semblables aux plaquettes existeraient chez tous les animaux doués d'un système circulatoire. Les Echinodermes en sont dépourvus.

Physiologie des plaquettes sanguines :

A la suite des travaux fondamentaux de HAYEM, LE SCURD & PAGNIEZ, ACHARD & AYNAUD, des travaux plus récents de ROSKAM, TOCANTINS, QUICK, BURSTEIN & BESSIS, etc... un triple rôle leur a été reconnu :

1°) rôle dans l'hémostase : "La plaquette est le facteur le plus important de l'hémostase, puisqu'elle semble participer à tous les mécanismes dont dispose l'organisme pour arrêter la perte de sang" (QUICK).

Classiquement, les plaquettes circulantes adhèrent et s'agglutinent au niveau de la moindre lésion vasculaire, l'endothélium lésé se comportant comme une surface mouillable. Elles forment le thrombus blanc ou "clou hémostatique" de HAYEM, autour duquel s'organisera le thrombus rouge ou caillot définitif.

L'absence d'agglutinats plaquettaires, par insuffisance numérique ou fonctionnelle, conditionne, en partie du moins, l'allongement du temps de saignement observé en pathologie humaine.

Inversement, une hyperactivité des plaquettes conditionne la thrombose : une importante étude de MOOLTEN & coll. (1949, 60) souligne le rôle essentiel des plaquettes dans la genèse des thromboses, associé à celui des altérations de l'endothélium vasculaire. Les plaquettes agissent en raison directe de leur nombre et aussi de leur adhésivité. La quantité et l'adhésivité des plaquettes sont contrôlées simultanément par

un double mécanisme physiologique : accroissement sous l'influence de la "thrombocytosine" (substance lipidique d'origine tissulaire) ;

- réduction sous l'influence du "thrombocytopène" (substance lipidique d'origine splénique).

2°) Rôle dans la coagulation proprement dite : il est difficile à exposer en raison de la complication des schémas modernes de la coagulation.

Enoncé des 1882 par BIZZOZERO, il a été ensuite considéré avec des fortunes diverses. L'évolution générale de nos connaissances sur la coagulation conduit à distinguer trois tendances successives :

I) la coagulation est figurée par un schéma très simple, celui de MORAWITZ (1905), un rôle favorisant étant reconnu aux plaquettes. Les 4 facteurs classiques de la coagulation interviennent en 2 stades successifs :

Thromboplastine + Prothrombine $\xrightarrow{\text{Calcium ionisé}}$ Thrombine

Thrombine + Fibrinogène $\longrightarrow$ Fibrine

La thromboplastine est d'origine tissulaire. Mais le rôle adjuvant des plaquettes est admis par MORAWITZ lui-même, qui voit en elles une source complémentaire de thromboplastine. BORDET & DELANGE extraient des plaquettes par l'alcool, une substance lipidique douée d'activité coagulante, qu'ils dénomment la "cytozyme".

2) la coagulation est l'oeuvre des seuls facteurs plasmatiques : successivement NOLF (1912), puis LENGGENHAGGER (1936) nient l'intervention des plaquettes dans la coagulation.

LOZNER & TAYLOR (1942) font intervenir l'action des surfaces étrangères sur les protéines plasmatiques, réduisant le rôle des plaquettes à celui d'un catalyseur de surface.

L'un des arguments invoqués à l'appui de cette conception est que la diminution du nombre des plaquettes n'entraîne pas l'allongement du temps de coagulation.

3) depuis une dizaine d'années, les schémas de la coagulation se compliquent à l'extrême, avec intervention de nouveaux facteurs, à l'origine desquels les plaquettes retrouvent une place non négligeable.

Un progrès décisif a été marqué par l'introduction des silicones dans le matériel expérimental (JAQUES et coll., 1946) : les physiologistes disposant désormais d'un plasma natif, pur de l'addition de tout anticoagulant, ont pu préciser la part des surfaces étrangères, dont l'action s'exerce au maximum sur les plaquettes. D'autre part, les techniques de séparation des éléments figurés et des composants plasmatiques

se sont améliorées.

Nous renvoyons pour plus de détails aux articles fondamentaux de QUICK (1949, 70) et STEFANINI (1951, 78 - 1953, 78 bis) - OWREN (1947, 65 - 1951, 66) - ALEXANDER (1952, 1) - TZANCK & BURSTEIN (1946, 84) - SOULIER & LARRIEU (1952, 77).

Voici l'essentiel des acquisitions nouvelles :

(a) La thromboplastine existe dans le plasma sous une forme inactive, le thromboplastinogene (globuline anti-hémophilique ?), dont l'activation nécessite une enzyme d'origine plaquettaire, la thromboplastinogénase (QUICK). La présence d'une thromboplastine active, au sein des plaquettes elles-mêmes, a été longtemps discutée. On admet actuellement qu'elles possedent une activité thromboplastique faible, susceptible d'être considérablement accrue au contact de facteurs plasmatiques (WILSTONE, ALEXANDER).

b) Dans la transformation (on dit aussi : consommation ou conversion) de la prothrombine en thrombine, interviennent deux groupes d'accélérateurs plasmatiques :

1 - la pro-accélérine (OWREN, 1951) ou Facteur V (OWREN, 1947), ou Accélerator-globulin (VARE & SEEGERS), ou Facteur labile de QUICK, est thermolabile, non retenue par les adsorbants de la prothrombine, peu sensible à l'action du dicoumarol;

2 - la pro-convertine (OWREN, 1951) ou co-facteur V (OWREN, 1947) ou Facteur VII (KOLLER), ou Co-thromboplastine (MANN & HURN), probablement identique au S.P.C.A. (Serum Prothrombin Conversion Accelerator d'ALEXANDER & de VRIES), est relativement thermostable, et beaucoup plus proche de la prothrombine, dont elle se distingue néanmoins par ses propriétés d'adsorption.

Pro-convertine et pro-accélérine ne sont en fait que des précurseurs d'une convertine et d'une accélérine qui se forment au cours de la coagulation.

Dans quelle mesure ces accélérateurs ont-ils leur origine dans les plaquettes ? Ceci n'est pas encore précisé, mais fait l'objet d'actives recherches. L'action favorisante des plaquettes sur la conversion de la prothrombine a été notée par BRINKHOUS (1947), MANN, HURN & MAGATH (1947), QUICK, SHANBERGE & STEFANINI (1949). On sait que la consommation de prothrombine est réduite lorsque le taux des plaquettes est déficitaire. Ce défaut est corrigé "in vitro" par addition d'une suspension plaquettaire (QUICK, 1949) - BRINKHOUS (1949), ALEXANDER & Coll. (1951), - "in vivo" par une transfusion massive de plaquettes (DAMESHEK & coll.,1949). Et la mesure du taux de consommation de la prothrombine (BRINKHOUS,SOULIER) constitue un excellent test de l'activité plaquettaire "in vivo".

Le facteur responsable, hydrosoluble, isolé par MANN & HURN (1947), par WARE, FAHEY & SEEGERS (1947), a été baptisé par STEFANINI accélérateur plaquettaire n° 1. MANN & HURN ont rapproché son action de celle de l'Ac-globuline du sérum : ce serait donc une accélérine.

Pour OWREN, les plaquettes agiraient indirectement, en activant la pro-convertine.

c) En outre la transformation du fibrinogene en fibrine paraît activée par un autre facteur plaquettaire, l'accélérateur plaquettaire n° 2, également hydrosoluble, mais séparé du facteur n° 1 par adsorption-élution (WARE, FAHEY & SEEGERS, 1947, 93 - VAN CREVELD & PAULSSEN, 1951, 87 bis - STEFA-NINI, 1953, 78 bis).

Il s'y ajoute un facteur plaquettaire n° 3, anti-héparine, décrit par CONLEY & al., 1948, - VAN CREVELD & PAULSSEN, 1951, - STEFANINI, 1953. Insoluble dans l'eau pure, il est probablement identique au facteur throm-boplastique déjà cité.

Enfin dernierement JOHNSON & SCHNEIDER ont attribué aux plaquettes une action antifibrinolysine (1953).

Ainsi les plaquettes pourraient être à l'origine, sinon de l'ac-célérine, tout au moins de divers activateurs (ou anti-inhibiteurs) de la coagulation. Ce rôle accélérateur étant admis, il n'est pas sûr qu'elles soient strictement indispensables : leur présence en petit nombre suffit à déclencher les réactions en chaîne qui donnent naissance à la thrombo-plastine, puis à la thrombine et enfin à la fibrine. La coagulation est compatible avec une consommation infime de la prothrombine : ceci expli-que que les plaquettes ne conditionnent pas en règle générale le temps de coagulation.

Par ailleurs, on reconnaît la nécessité du contact de surfaces mouillables, qui en lysant les plaquettes libèrent des activateurs de la coagulation (PATTON & col., 1948). Dans le même sens agiraient la thrombi-ne (QUICK : "l'action labilisante de la thrombine sur les plaquettes repré-sente un des chaînons de la réaction auto-catalytique"), et expérimentale-ment : le sérum dilué (MANN & Coll.,1951).

certaines globulines (MILSTONE, 1948),

certaines enzymes protéolytiques (MILSTONE -TRAVIS & FERGUSON, 1951).

Nous donnerons pour terminer ce schéma d'une valeur très provi-soire :

I - THROMBINO-FORMATION :

1. Thromboplastinogene $\xrightarrow{\text{Enzyme plaquettaire + Surface}}$ Thromboplastine

Proconvertine $\longrightarrow$ Convertine

2. Prothrombine $\xrightarrow{\text{Thromboplastine + Accél.plaq.N° I + } Ca^{++}}$ Thrombine (réaction lente)

3. Thrombine + Proaccélérine $\longrightarrow$ Accélérine

4. Prothrombine $\xrightarrow{\text{Accélérine + Convertine + Thromboplastine + } Ca^{++}}$ Thrombine (réaction accélérée)

II - FIBRINO-FORMATION :

5. Fibrinogène $\xrightarrow{\text{Thrombine + Accél.plaq. N° 2}}$ Fibrine

3°) Rôle dans la rétraction du caillot : la rétraction du caillot est le phénomene physiologique où le rôle des plaquettes a été le plus anciennement et le plus solidement établi (HAYEM, 1896 - LE SOURD & PAGNIEZ, 1907 - cf. plus récemment QUICK, 1949, 70, etc...).

Classiquement elle est proportionnelle au nombre de plaquettes présentes (si l'on fait abstraction du "lest" globulaire) et nécessite des structures intactes : les plaquettes traitées par le formol ont perdu leur aptitude à rétracter le caillot (BURSTEIN & BESSIS, 1948, 12). Les efforts tendant à isoler un facteur enzymatique (rétractozyme ou autre) ont jusqu'à présent échoué.

Signalons toutefois que FONIO (1950,36) a réussi récemment, en lysant par ultra-sons des plaquettes de porc et en les soumettant à une centrifugation énergique, à séparer le granulomère (seul actif dans la coagulation) du hyalomère (seul actif sur la rétraction du caillot). Selon FONIO, les granules plaquettaires, analogues aux vésicules signalés par RIHS au sein des thrombocytes de toute la série animale, représentent une véritable sécrétion interne.

En résumé et dans l'état actuel de nos connaissances, le rôle des plaquettes du sang de l'homme et des Mammiferes est essentiel dans l'hémostase et la rétraction du caillot (ou elles interviennent à la fois par leur nombre et leur adhésivité), important dans la coagulation (qu'elles favorisent par la libération d'accélérateurs).

Physiologie comparée :

Dans les formes inférieures de la vie, les amcebocytes ou cellules fusiformes sont les seuls éléments du sang qui jouent un rôle dans la formation du caillot. Apres une blessure des vaisseaux de l'animal, ou apres l'exposition du sang à une surface étrangere, ces cellules subissent une

"métamorphose visqueuse" qui conduit à la formation d'un réseau très fragile.

Chez les Crustacés, ce mode de coagulation s'observe encore, mais il est immédiatement suivi de la transformation du fibrinogène plasmatique en fibrine, ce qui renforce le caillot.

Chez l'Oiseau, le début de la métamorphose visqueuse et le dépôt de fibrine s'observent presque simultanément, le caillot solide et compact est en outre rétractile.

Chez les Mammifères enfin, les plaquettes, bien que dépourvues de noyau apparent, se présentent comme des structures hautement spécialisées, mais dont le mode d'action est fondamentalement le même que dans les classes inférieures (métamorphose visqueuse au contact des surfaces mouillables).

B) - DONNEES CONTROVERSEES : La plaquette est-elle une cellule vivante ? Ce probleme a suscité depuis plus de cinquante ans des débats passionnés. Successivement cytologistes, physiologistes, chimistes ont apporté des arguments pour ou contre la vitalité des plaquettes.

Les positions les plus extrêmes sont représentées d'un côté par ceux qui ont décrit des mitoses plaquettaires, de l'autre par ceux qui ne voient dans les plaquettes que des artefacts, sorte de précipités d'origine plasmatique. Entre ces opinions radicalement opposées, se placent les auteurs qui admettent l'autonomie des plaquettes, mais hésitent à leur reconnaître le caractère de cellules completes (débris cytoplasmiques ou éléments nucléés ?).

ROSKAM (1927, 74) et plus rédemment BUDTZ-OLSEN (1951, 11) ont passé en revue les principaux arguments qui permettraient de considérer les plaquettes comme des cellules vivantes. Ces arguments sont de valeur très inégale. Avant de les soumettre à un examen critique rapide, il convient de définir la cellule à la lumière des travaux modernes.

Quelles sont les caractéristiques d'une cellule ?

I) sa morphologie : la membrane, le contour et le contenu de la cellule (chondriome, vacuome, plastes, etc.) sont susceptibles de variations considérables. Seul de tous les organites, le noyau (unique ou multiple, nucléolé ou non) est indispensable à la définition de la cellule.

2) sa mobilité : à moins qu'elle ne soit liée à un appareil cinétique différencié elle ne constitue pas un test suffisant, puisque des fragments cytoplasmiques tels que ceux d'une amibe énucléée possèdent une mobilité réduite.

3) sa respiration et son métabolisme persistant, indépendant du milieu : ces phénomènes s'observent pendant des semaines entières sur des cellules privées de leur noyau (BRACHET, 1952, 9).

4) son accroissement aux dépens du milieu extérieur : on prête aux ribonucléo-protéines cytoplasmiques un rôle essentiel dans la synthèse des protéines, mais le noyau possède un "rôle d'induction" primordial.

5) la possibilité de se diviser : directe ou indirecte, aucune division n'est concevable sans un noyau, dont les chromosomes sont les supports obligatoires des gènes.

6) sa constitution chimique , et notamment sa richesse en nucléoprotéines: les ribo-nucléoprotéines sont des constituants facultatifs du cytoplasme; localisées récemment dans les microsomes, elles existent également dans les nucléoles et fréquemment dans le noyau lui-même.

Les désoxyribonucléoprotéines sont les constituants caractéristiques du noyau, mais non exclusifs puisque la ribo-nucléo-protéine peut s'associer à la chromatine.

Aussi bien ne retiendrons-nous pas des arguments aussi peu significatifs que la réduction du bleu de méthylène, la sensibilité aux poisons, aux colorants, aux variations thermiques, avancés par les anciens auteurs.

Rappelons seulement les données les plus solidement établies à l'heure actuelle.

I) L'étude morphologique des plaquettes, n'a jamais montré de vrai noyau : du moins pourrait-on considérer les granules comme des éléments d'un noyau diffus ou masqué, qui n'aurait pu jusqu'à présent être caractérisé. La démonstration d'un organite équivalant au noyau chez les Bactéries est une acquisition récente.

2) La mobilité signalée en 1920 par VAN HERWERDEN semblait liée à un artefact. L'étude micro-cinématographique en contraste de phase de BESSIS & BRICKA (1952, 5) vient de mettre en valeur cette propriété plaquettaire, mais ce n'est pas une preuve formelle de l'intégrité cellulaire.

3) Quelques systèmes diastasiques ont été reconnus présents dans les plaquettes. La consommation d'oxygène a été notée, bien qu'il n'ait pas été établi de quotient respiratoire. Or métabolisme et respiration sont compatibles avec l'absence de noyau.

4) Les plaquettes observées, soit dans la moelle osseuse, soit dans le sang, soit en culture de tissus, ne montrent pas d'accroissement de leur substance : leur vie est, il est vrai, de l'ordre de quelques jours.

5) Si l'on excepte les affirmations hasardeuses de LIVADAS (1937), aucune vraie mitose n'a été mise en évidence.

6) La chimie et l'histochimie, dont nous rapporterons plus loin les données détaillées, montrent l'existence de protéines, de lipides, de glucides, constituants habituels de la matière vivante. Mais cela n'implique pas que la plaquette soit une cellule entière. Un élément essentiel serait la caractérisation d'une substance nucléaire, notamment par l'identification de l'acide désoxyribonucléique. Or nous verrons que son existence est discutée, et qu'elle apparaît même peu probable à la majorité des auteurs.

o
o o

L'étude de la nature cellulaire des plaquettes sanguines mérite donc d'être reprise : les données histochimiques sont contestées, les notions de chimie recueillies à leur sujet sont rares et entachées de suspicion, et leur métabolisme n'a été que peu exploré.

Nous avons ainsi défini l'objet de notre travail.

Il nous a paru utile d'exposer, dans une première partie, la méthode originale de séparation qui l'a rendu possible, et de préciser certaines données physiques relatives aux plaquettes.

Puis nous nous sommes adressés à la chimie pour l'analyse d'échantillons plaquettaires purs, et notamment la recherche des acides nucléiques (conjointement à l'histochimie) : ceci constituera notre seconde partie.

La troisieme partie, plus brève, sera consacrée à l'étude de la respiration des plaquettes et de quelques systèmes enzymatiques.

Enfin, en quatrième partie, une discussion générale nous permettra de tirer nos propres conclusions.

CHAPITRE I

METHODES DE SEPARATION DES PLAQUETTES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Une séparation parfaite est la condition primordiale de toute étude chimique ou physiologique des éléments sanguins. Or le sang circulant constitue la seule source valable des plaquettes, qui représentent en volume 0,42% du sang total. La méthode de séparation choisie devra concilier deux exigences pratiquement opposées, qui sont la pureté et l'intégrité cellulaire. Toute manipulation tendant à accroître la pureté risque d'altérer les plaquettes, particulièrement fragiles au contact des surfaces mouillables.

A) RAPPEL DES PROCEDES CLASSIQUES :

Si l'on met à part les méthodes basées sur l'hémolyse ("à priori" nocives pour les plaquettes), ils sont tous basés sur la différence des densités des éléments figurés du sang (Note 2).

Le sang recueilli sur une solution anticoagulante (citrate ou oxalate de sodium, héparine,etc...) est centrifugé ou soumis à la sédimentation.

Note 2 : Voici d'après ENDRES & HERGET (1929, 28) pour le sang de cheval, et d'après VALLEE, HUGHES & GIBSON (1947,86), et TULLIS (1952, 82) pour le sang humain, les densités respectives des éléments figurés du sang et du plasma :

	Cheval	Homme	
Hématies	1,085	1,090	1,092
Leucocytes	1,058	1,065	1,065
Plaquettes	1,054	(1,050)	1,030
Plasma	1,0285	1,026	.....

Sédimentation et centrifugation obéissent à la loi de STOKES: "La vitesse de chute d'une petite sphère solide dans un milieu visqueux est fonction du rayon et de la densité de la sphère, de la densité et de la viscosité du milieu, et de l'accélération due à la pesanteur (ou à la centrifugation)".Plus légères et plus ténues (leur diamètre: 1,5 à 3 microns, est notablement inférieur à celui des hématies: 7 microns, et celui des leucocytes: 8 à 12 microns),les plaquettes se déposeront donc le plus lentement.Ceci n'est valable,bien entendu,qu'à la condition qu'il n'y ait pas d'agglutination.

1°) - La sédimentation spontanée, rapide pour le sang de cheval (5 à 7 heures) (LOHNER) est lente et incomplète dans le cas du sang humain normal (24 heures ou plus).

Cette sédimentation peut être artificiellement accélérée : ainsi EMERSON a utilisé récemment (1949) le fibrinogène (fraction I du plasma de COHN). Après 60 à 90 minutes, le sang additionné de fibrinogene a sédimenté suffisamment pour que le plasma, qui contient en suspension la majorité des éléments blancs puisse être recueilli par un dispositif convenable. On élimine les leucocytes par une nouvelle sédimentation ou une centrifugation douce. Mais les plaquettes ne seraient extraites à leur tour que par une centrifugation de 30 minutes à 2.500 - 3.000 tours, qui entraîne leur agglutination. De l'avis même de l'auteur, ce n'est pas un procédé idéal de séparation des plaquettes.

2°) - On a le plus souvent recours à la centrifugation fractionnée, préconisée par MORAWITZ dès 1904 :

a) Une première centrifugation douce (par exemple de 10 minutes à 800 tours) chasse dans le culot hématies et leucocytes, et laisse les plaquettes en suspension dans le plasma surnageant, qui est recueilli par aspiration.

Si l'on s'en tient à ce premier temps, cette centrifugation unique fournit un plasma riche en plaquettes (taux voisin de celui des plaquettes dans le sang entier), qui convient à des examens morphologiques et à l'étude de la coagulation. Ainsi pour FONIO & SCHWENDENER (1942,35),BURSTEIN & BESSIS (1948,12).

b) Si le liquide surnageant est centrifugé à son tour, plus énergiquement (par exemple 20 minutes à 3.000 tours), les plaquettes passent dans le culot en compagnie de quelques globules rouges et blancs. Ceux-ci sont éliminés ainsi que le plasma résiduel, par 2 ou 3 lavages successifs en solution physiologique, en reprenant à chaque fois la partie supérieure du culot. On obtient ainsi des crèmes plaquettaires de plus en plus pures, mais le rendement est conditionné par l'importance du matériel sanguin disponible.

De nombreux auteurs ont utilisé cette méthode de séparation, avec quelques variantes, notamment : ROHR & KOLLER (1936,72) - FONIO (1936 et 1950, 36) - TOCANTINS (1937,80) - STEFANINI (1944) - COPLEY & HOULIHAN (1947, 21) - MANN, HURN & MAGATH (1947) - WARE, FAHEY & SEEGERS (1948,93) - MOND & SINGER (1951) - TRAVIS & FERGUSON (1951).

Par contre, KLECKI & PELCZAR (1926) - VAN ALLEN (1926, 87) - ENDRES & HERGET (1929,28) - HORWITZ (1930,48) - CHARGAFF (1936,16) - LOHNER (1939, 56) combinent la sédimentation (de 5 à 24 heures suivant l'échantillon de sang) et la centrifugation fractionnée.

3°) - Pour obtenir d'emblée une séparation plus précise, certains auteurs ont imaginé des tubes à centrifuger spéciaux;

a) HANAUSEK (1933,42) - BUTLER & CUSHMAN ("waisted tubes") (1940,13) - GOHAR (1943, 39) - BESSIS (1948,4) - CHEVILLARD & HAMON (1948,18) ont décrit et utilisé des tubes à centrifuger rétrécis dans leur section médiane, pour isoler dans un même temps leucocytes et plaquettes. Cet appareillage permet de traiter de petites quantités de sang (10 à 60 ml), mais il nécessite un calibrage soigneux et une détermination préalable de l'hématocrite du sang à centrifuger.

D'autre part, la purification relative de la suspension plaquettaire n'est obtenue qu'après 2 ou 3 lavages : en voici, d'après CHEVILLARD & HAMON, les étapes successives :

	Plaquettes	Leucocytes	Hematies
dans la section médiane	99,36%	0,56%	0,08%
après une centrifugation supplémentaire	99,67%	0,32%	0,01%
après 2 centrifugations	99,95%	0,056%	0,00%

b) ENDRES (1927,26) propose un tube à centrifuger spécial de faible capacité; Van ALLEN (1926,87) et à sa suite HORWITZ (1930,48) utilisent en vue de la détermination du volume plaquettaire une chambre de sédimentation en forme de sablier, et un "thrombocytocrite" (petit tube comportant une extrémité effilée).

COPLEY & HOULIHAN (1947,21) ont étudié parallèlement 2 méthodes de séparation des plaquettes de l'homme et du chien :

- l'une partant de sang recueilli sur anticoagulant,
- l'autre utilisant un sang dilué de 10 à 15 fois en solution physiologique, sans addition d'anticoagulant.

Il faut 6 ou 7 centrifugations successives, les dernières en tubes spéciaux (tubes comportant une effilure terminale comme le thrombocytocrite) pour obtenir une suspension plaquettaire pure.

Ajoutons que le matériel d'HORWITZ, de TOCANTINS, de CHEVILLARD & HAMON est paraffiné, tandis que celui de SPADOLINI et d'EMERSON est siliconé.

B) <u>TENDANCES NOUVELLES</u> : Les travaux des auteurs américains (Canada, Etats-Unis) ont mis en évidence la nocivité à l'égard des plaquettes (et des leucocytes) :

- des surfaces mouillables (verre, métal, caoutchouc);
- des facteurs de la coagulation (thrombine);
- des anticoagulants classiques (citrate, oxalate, héparine).

Il en est résulté :

- l'apparition d'un matériel nouveau (récipients de matière plastique non mouillable : Teflon, Nylon, Kel, etc... - à défaut : récipients siliconés),

- et la suppression des anticoagulants classiques, le sang étant décalcifié par passage sur une résine échangeur d'ions (Amberlite ou Dowex en "cycle sodium"). Ce dernier procédé aurait l'avantage d'agir également sur le second facteur nocif, en évitant l'apparition de la thrombine (le citrate masque la coagulation, mais ne s'oppose pas aux phénomènes chimiques du début de la coagulation).

Dans le même ordre d'idées, le sel disodique de l'acide éthylènediamine tétra-acétique ou Séquestrène, a été préconisé comme anticoagulant favorable à la survie des éléments figurés.

Pour obtenir des plaquettes utilisables en transfusion, HIRSCH et ses collaborateurs (1951,45), DILLARD (1951,24) procèdent à la centrifugation fractionnée d'un sang recueilli sur séquestrène.

MINOR & BURNETT (1952, 59) proposent dans le même but une méthode en 2 temps : sédimentation accélérée par le Dextran d'un sang récolté sur solution A.C.D., puis centrifugation de la couche surnageante après addition d'une substance tensio-active (Triton), qui prévient l'agglutination des plaquettes.

Enfin deux méthodes de séparation utilisent des principes entièrement nouveaux :

1) centrifugation continue, par étages successifs de bols en matière plastique, d'un sang fraîchement recueilli et décalcifié par passage sur résine Dowex; l'accélération, exactement calculée pour chaque bol, permet de séparer dans l'ordre globules rouges, globules blancs et plaquettes, puis le plasma qui subit lui-même un fractionnement : c'est le "falling film centrifuge" du Dr. COHN et de ses élèves (1950, 25). Mais 40% des plaquettes, environ, sont retenues par la résine.

2) récupération, par lavage, des plaquettes électivement retenues par la colonne de résine (FREEMAN, 1951, 37). La fixation des plaquettes serait plus sélective si l'on substitue I m.eq./L de calcium au sodium de la résine échangeur d'ions (TULLIS).

TULLIS (1952,82) a publié récemment une revue sur cette question, qui paraît en pleine évolution.

C) <u>TECHNIQUE PERSONNELLE</u> : Nous ne disposons pas actuellement des appareils perfectionnés américains, dont l'utilisation reste encore du domaine de la recherche. Mais nous avons systématiquement appliqué les techniques du siliconage (à l'aide du Dri-Film 9986, puis du Rhodorsil 240, en solution ou à l'état de vapeurs).

La préparation du plasma par centrifugation du sang humain citraté, dans un Centre de Transfusion opérant à l'échelle industrielle, a pour conséquence heureuse de fournir des quantités importantes de culots globulaires stériles. Cette circonstance ne permet ni la centrifugation fractionnée (les plaquettes étant déjà rassemblées dans la couche intermédiaire ou tapis leucocyto-plaquettaire), ni l'usage de tubes de BESSIS. Des centrifugations répétées de ces culots globulaires, en reprenant à chaque fois la couche la plus riche en plaquettes, nous ont donné pendant longtemps des résultats médiocres.

En 1950-1951, nous avons mis au point, avec CHARY (58) un procédé de séparation original qui fournit sous un volume important une suspension plaquettaire très riche et d'emblée voisine de la pureté.

Voici notre protocole habituel :

1) récolte du sang : 15 à 60 flacons renfermant chacun 400 ml de sang recueillis sur 100 ml d'une solution de citrate trisodique à 2,5 %;

2) première centrifugation (2.800 tours pendant 30 minutes) (soit 2.500 G.), suivie du prélèvement aseptique du plasma;

3) réunion par aspiration des éléments figurés les plus légers (plaquettes et globules blancs, plus un certain nombre de globules rouges et le plasma résiduel) dans un flacon siliconé de 550 ml. La réunion de 12 à 15 tapis leucocyto-plaquettaires (correspondant à 5 à 6 litres de sang) constitue une unité de "suspension globulaire enrichie";

4) nouvelle centrifugation exactement calculée (13 minutes à 2.500 tours, soit 2.000 G.) pour répartir le contenu du flacon en 4 couches suffisamment mobiles;

5) séparation par notre dispositif spécial : une pipette à double courant est adaptée au col du flacon, ce qui permet d'introduire au fond du récipient une solution dense de glucose : d = 1.200. Cette solution dense agissant à la manière d'un piston liquide, chasse successivement vers le col de cygne de la pipette, dans l'ordre des densités croissantes, les 4 couches :

   a) plasma,
   b) plaquettes,
   c) globules blancs,
   d) globules rouges.

6) récolte et lavages de la crème plaquettaire : on recueille, dans un tube à centrifuger siliconé de 35 ml, 30 ml d'une crème de teinte jaune chamois, riche de 25 à 30 millions de plaquettes au millimètre cube, avec quelques milliers de leucocytes et d'hématies. Deux lavages successifs en solution physiologique (centrifugation de 15, puis 12 minutes à

6.400 tours, soit 1.500 G) ont pour effet d'éliminer d'une part les derniers globules rouges et blancs, d'autre part le plasma. Après chaque lavage, on décante le liquide surnageant, et la partie supérieure du culot est transportée dans un nouveau tube siliconé.

Un troisième et dernier lavage se fait dans un tube à centrifuger conique de 15 ml : la partie supérieure du culot est constituée par une crème blanche, épaisse, qui constitue la récolte définitive. De l'ordre du gramme, en poids frais, elle renferme de 45 à 60 millions de plaquettes au millimètre cube, selon l'importance de la dernière centrifugation.

Au cours de ces lavages, nous avons perdu 80 à 90 % des plaquettes rassemblées dans le flacon d'enrichissement, mais cette perte est compensée par la pureté extrême du restant (1 leucocyte pour 50.000 plaquettes; globules rouges et plasma totalement éliminés) (cf. figure 6). On appréciera la qualité de cette séparation en se reportant aux travaux antérieurs qui mentionnent un leucocyte pour 2.000 plaquettes (or en poids 1 leucocyte vaut environ 100 plaquettes).

La durée totale de l'opération, depuis la collecte du sang jusqu'au dernier lavage, est de 6 à 7 heures (Note 3). Si le protocole expérimental l'exige, elle est pratiquée au voisinage de 0° C., et dans des conditions de stérilité rigoureuses.

Une possibilité intéressante est fournie par la lyophilisation : la crème plaquettaire pure, congelée à - 35° C. puis desséchée dans le vide, prend l'aspect d'une poudre d'un blanc neigeux. Ce matériel, dont la conservation est assurée par une nouvelle mise sous vide, convient parfaitement à l'étude chimique.

Note 3 : Il est évident qu'une période de quelques heures peut suffire aux phénomènes d'autolyse pour se manifester; d'autre part la respiration et le catabolisme ne sont pas arrêtés. Ceci peut être objecté à notre travail, ainsi que l'éventualité d'une sélection: nous y reviendrons dans la discussion d'ensemble.

Partant à chaque fois d'un mélange de sangs normaux, nous obtenons régulièrement des échantillons comparables.

CHAPITRE II

DONNEES PHYSIQUES RELATIVES AUX PLAQUETTES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

En l'absence de documents valables, nous avons été conduits à établir nous-mêmes les corrélations nécessaires à la précision des recherches. Ainsi avons-nous déterminé parallèlement sur un grand nombre de préparations, la teneur en plaquettes et le poids sec.

La densité et le volume moyen des plaquettes ont été étudiés à titre accessoire.

A) - DONNEES ANTERIEURES :

I°) - La densité des plaquettes sanguines du cheval a été estimée à 1,054 par ENDRES & HERGET (1929,28); à 1,050 (valeurs extrêmes : 1,045 et 1,053) par LOHMER (1939,46). Cet auteur a utilisé les méthodes pycnométrique et aréométrique, et noté des divergences sensibles entre les résultats de ces deux méthodes, la première donnant des valeurs plus faibles.

2°) - Le volume individuel moyen des plaquettes sanguines de l'homme est de 5 microns cube pour HORWITZ (1939,49),
et 7,3 microns cubes pour OLEF (1937,63).

TOCANTINS (1937,80) reproche à ces auteurs de s'être basés sur des valeurs de numération trop fortes, et propose 10 à 12 microns cube. Cependant GRAFFLIN (1941,40) attribue aux plaquettes un volume individuel moyen de 4,19 microns cube.

3°) - La correspondance entre le chiffre des plaquettes et leur poids sec n'a fait l'objet, à notre connaissance, d'aucune publication.

B) - DONNEES ORIGINALES :

I°) - Numération et contrôle de la pureté des préparations :

Les méthodes classiques conviennent à la numération des plaquettes dans le sang humain (normal ou pathologique) ou dans le plasma de sédimentation. Mais elles ne sont pas applicables à des suspensions plaquettaires

aussi riches que celles qui font l'objet de notre étude. En conséquence, nous avons dû recourir à quelques artifices, et mettre au point la technique suivante :

a) - première dilution en liquide de Marcano, au 1/20 : par exemple on transporte 0,1 ml de crème plaquettaire, prélevé à l'aide d'une pipette à antigène (du modele utilisé en sérologie), dans 1,9 ml de liquide de MARCANO, avec aspirations et rejets successifs. Cette manoeuvre fournit une suspension qui est encore très opaque, mais qui se prête à l'aspiration dans une pipette capillaire.

b) - après agitation soigneuse (dans un tube de VERNES siliconé), seconde dilution au 1/100, dans une pipette à globules rouges.

c) - numération en cellule de THOMA, après une attente de vingt minutes. Il suffit de compter les plaquettes contenues dans 80 carrés (soit 1/5 de la surface quadrillée de la cellule) et de multiplier le chiffre obtenu par 100.000 pour connaître le nombre de plaquettes par millimètre cube (Note 4).

L'homogénéité de la préparation est indiquée par une concordance satisfaisante entre les chiffres trouvés dans les bandes de 2o carrés, et par l'absence d'agglutinats.

Nous avons trouvé intérêt à pratiquer la lecture au grossissement x 40 de l'objectif à contraste de phase du microscope WILD, qui donne des plaquettes une image très nette, en noir sur fond pâle.

D'autre part, à l'exemple de FEISSLY (1949,32) nous avons substitué parfois au liquide de MARCANO une solution hypotonique de cocaïne (ou de novocaïne) : ce milieu fait gonfler légèrement les plaquettes, qui prennent toutes une forme arrondie et se reconnaissent facilement.

La précision de la numération tiendra surtout aux conditions du prélèvement effectué au sein de la crème plaquettaire, qui est visqueuse et imparfaitement homogène, toujours plus riche en eau au voisinage de sa surface. Deux prélèvements au moins sont indispensables.

Numération des globules rouges et blancs:

Le petit nombre de ces éléments, qui ne sont détectés qu'à titre accidentel, s'accommode mal de la double dilution imposée par la richesse

---

Note 4 : En effet la capacité de la cellule de THOMA est de 1/10 de millimètre cube; on a exploré 1/5 de la totalité du quadrillage, soit 1/50 de millimètre cube et la dilution finale est de 20 x 100 = 2.000.

en plaquettes. Si l'on recherche des globules sur toute la surface quadrillée de la cellule de THOMA, un globule blanc ou rouge isolé est compté pour 20.000, d'où une imprécision évidente.

Pratiquement les globules rouges, dont la présence est exceptionnelle, ne font pas l'objet d'une numération spéciale. Quand ils existent, ils se reconnaissent sur le frottis de contrôle coloré au MAY-GRUNWALD-GIEMSA.

Les globules blancs sont comptés en cellule de NAGEOTTE, après avoir étendu au 1/10° en bleu acétique (solution de LAZARUS) la dilution première au 1/20°. Malgré l'abondance des plaquettes incomplètement lysées, les leucocytes s'identifient assez bien, en éclairage ordinaire, grâce à leur noyau teinté. La numération de 8 bandes (soit 10 millimètres cube) donne un chiffre qui sera multiplié par 20.

D'autre part, un frottis de contrôle, coloré au MAY-GRUNWALD-GIEMSA, est toujours pratiqué, et conservé à titre de référence. Les leucocytes, intacts ou le plus souvent désintégrés (une ombre ou un noyau ne compte comme un leucocyte entier) se répartissent très inégalement suivant que l'on examine le centre ou la queue du frottis. Ainsi que pour toute préparation hématologique, il conviendra de faire une moyenne.

Les plaquettes, trop nombreuses pour être pointées individuellement, sont comptées par champs entiers de l'objectif à immersion (de 800 à 2.000 par champs, suivant l'épaisseur de l'étalement). Le chiffre des leucocytes rencontré est rapporté à 100.000 plaquettes, après examen de 50 à 125 champs successifs.

Nous devons admettre que cet examen est assez imprécis, et que ses résultats ne se superposent que grossièrement à ceux de la numération directe. Quoi qu'il en soit, le seul examen du frottis coloré permet de classer les préparations suivant leur degré de pureté. Une suspension plaquettaire pure ne doit pas contenir plus d'un leucocyte pour 20.000 plaquettes; très pure, un pour 100.000 plaquettes.

<u>Numération au photomètre</u> : Une suspension plaquettaire pure, diluée à un taux connu en solution saline physiologique, présente une certaine densité optique dont l'importance est directement proportionnelle à sa teneur en plaquettes.

Nous avons utilisé le photomètre de LAGAILLARDE : avec une cellule de 5 mm. et un écran jaune (570 mμ), l'unité de densité optique correspond à 2.700 plaquettes par millimètre cube. En raison des dimensions réduites à l'échelle de lecture, la dilution doit être poussée au 1/200°. Une dilution de 1/2.000° (celle que fournit la pipette de POTAIN qui a servi à la numération directe) donne une valeur un peu trop faible pour la précision. On multiplie les chiffres trouvés par 2.700 et par le taux de la dilution.

Cette méthode d'approximation peut rendre des services en raison de sa grande rapidité, mais elle ne vaut que pour des préparations fraîches.

2°) Relation entre poids frais, poids sec et concentration en plaquettes : Cette relation donne l'équivalence, en poids sec, d'un chiffre connu de plaquettes.

Le poids frais est déterminé par double pesée (balance de précision au 1/10° de milligramme; le poids sec, après dessiccation à l'étuve (110° C.) jusqu'à poids constant, sur des prises d'essai de l'ordre du gramme.

Le rapport poids sec/poids frais, pour des suspensions concentrées de 40 à 60 millions au millimètre cube, oscille entre 11,74 et 14,33 %, valeur moyenne de nos mesures : 12,5 % pour 50 millions). Il convient de noter que le produit sec, d'aspect cireux, se réhydrate rapidement à la sortie de l'étuve.

Le même rapport a été établi pour les préparations soumises à la lyophilisation (taux d'humidité inférieur à 1 %).

Si l'on a opéré sur une suspension plaquettaire très concentrée (ce qui permet de négliger l'apport en électrolytes du liquide de dilution), 1 milligramme en poids sec, représente environ 360 millions de plaquettes (note 5). Inversement 1 milliard de plaquettes fournit en poids sec environ 2,8 mg.

3°) Densité des plaquettes : Il nous a paru intéressant de calculer la densité des plaquettes du sang humain, malgré les difficultés de cette opération. La mesure porte en effet sur un produit très visqueux, imparfaitement homogene, et disponible en quantités restreintes. Si la centrifugation a été limitée, les résultats sont faussés par la teneur en eau de dilution. Par contre une centrifugation très poussée donne un produit compact qui se prête mal à l'aspiration dans une pipette finement calibrée.

Nous avons donc multiplié les essais, en variant le matériel et les conditions d'expérience. Des pipettes de 1/10° et de 1/20° de ml, étalonnées au mercure, représentaient l'avantage de permettre, aussitôt apres la pesée, la numération directe (par rejet dans un volume connu de liquide de MARCANO).

Voici les chiffres obtenus par double pesée à la balance de précision :

Note 5 : Ce chiffre ne s'accorde pas avec l'estimation récemment publiée par ALEXANDER (1952,1), qui fait correspondre 1 gamma d'azote à environ 200.000 plaquettes. Pour nous (cf. Chapitre Chimie), 1 milliard de plaquettes vaut 2,8 mg x 11 : 100, soit 0,31 mg d'azote. Un gamma d'azote correspond à 1.000.000 : 0,31, soit 3.100.000 plaquettes.

d = 1,0455 (pour 61.200.000 plaquettes au mm3);
d = 1,0460 (pour 52.000.000 plaquettes au mm3)

Un tube gradué de 1 ml, permettant d'opérer sur une plus grande quantité de crème plaquettaire, et de pousser ensuite la centrifugation nous a donné :

d = 1,0428 (pour 47.360.000 plaquettes au mm3)

Sur des volumes encore plus importants de l'ordre de 3 à 5 ml, nous avons trouvé :

d = 1,0363 (pour 47.000.000 plaquettes au mm3).

Ces chiffres représentent la densité (par rapport à l'eau à 4° C.) d'une suspension plaquettaire donnée, et non la densité réelle des plaquettes. Celle-ci ne peut être connue, dans nos conditions d'expérience, que par une extrapolation basée sur le résultat d'une centrifugation poussée jusqu'à volume constant. Compte tenu de la densité du liquide de dilution (ici 1,006) un calcul simple nous donne pour la dernière expérience la valeur de :

d = 1,053

Une préparation leucocytaire pure, étudiée dans les mêmes conditions, présentait une densité de 1,030 (valeurs extrêmes : 1,028 et 1,032) pour une teneur en eau de dilution de 60 %, soit, par extrapolation, une densité réelle de 1,066.

D'autres essais ont été pratiqués en faisant tomber une goutte de crème plaquettaire dans des solutions étalonnées de sulfate de cuivre (gamme de PHILLIPS & Van SLYKE pour la détermination de l'hématocrite): ils nous ont fourni des résultats comparables à ceux de la pesée des pipettes tarées.

En conclusion, et sans prétendre affecter à ce chiffre une valeur rigoureuse, nous admettons que la densité des plaquettes sanguines de l'homme est voisine de 1,053.

4°) Volume individuel moyen des plaquettes : Il est facile à exprimer, si l'on connaît l'espace minimum occupé par une suspension plaquettaire de concentration donnée. Pour les raisons exposées plus haut, une extrapolation aura été nécessaire, puisqu'une suspension plaquettaire trop compacte ne se prête pas à la numération. Après centrifugation poussée au maximum, jusqu'à volume constant, nous avons obtenu des concentrations de l'ordre de 70 millions, notre valeur théorique la plus forte ayant été de 73 millions de plaquettes au millimètre cube. Si l'on admet cette donnée, et toujours sous réserves, le volume plaquettaire moyen dans nos préparations, serait de 13,7 microns cube.

II ème PARTIE

CHIMIE ET HISTOCHIMIE

Un premier chapitre traitera spécialement des essais d'identification des acides nucléiques par les méthodes histochimiques. Nous y inclurons la recherche du phosphore nucléique, la détachant ainsi du second chapitre qui sera consacré à l'analyse chimique proprement dite.

CHAPITRE I

ESSAIS D'IDENTIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES PAR LES METHODES HISTOCHIMIQUES ET PAR LA CHIMIE.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Nous abordons ici un des chapitres les plus importants de l'histoire des plaquettes.

LILIENFELD a été le premier à affirmer, dès 1891, que les plaquettes contiennent de la substance nucléaire, en se basant sur la ressemblance entre leurs granulations et les noyaux des leucocytes (présence d'une nucléo-histone). DEETJEN, KOPSCH et DEKHUYSEN (1901) concluaient de leurs études et colorations que les thrombocytes étaient de vraies cellules, munies d'un noyau.

Ainsi se trouvait ouvert un débat qui s'est poursuivi jusqu'à ce jour, et qui n'a pas encore reçu sa solution.

La présente étude ayant une portée surtout qualitative, nous conserverons la distinction classique, d'ordre général, entre les deux types principaux d'acides nucléiques, l'acide désoxyribonucléique (DRN), caractéristique du noyau, et l'acide ribonucléique (RN), plus spécialement localisé dans le cytoplasme et les nucléoles. L'un et l'autre sont des polymères de tétranucléotides qui diffèrent par la nature du sucre et des bases pyrimidiques.

CHOIX D'UNE METHODE :

Les acides nucléiques peuvent être décelés et identifiés, à des titres divers :

soit par leur sucre,
soit par leurs bases puriques et pyrimidiques,
soit par le phosphore qui entre dans leur constitution.

En ce qui concerne l'acide DRN, deux voies bien différentes dans leur origine, mais dont les recoupements sont précieux, ont été ouvertes par les auteurs modernes :

I° les techniques histochimiques proprement dites, dont le type est la réaction de FEULGEN. Rappelons-en le principe : l'hydrolyse acide (par l'acide chlorhydrique normal) de l'acide DRN chasse la base purique et libère un aldéhyde, le désoxyribose, qui réagit avec la fuchsine-sulfite (réactif de SCHIFF) pour former un composé coloré en pourpre. La réaction de TURCHINI est basée sur le même principe d'hydrolyse préalable, mais le réactif coloré diffère.

2° la microspectrophotométrie dans l'ultra-violet (CASPERSSON) : elle permet une détection globale des acides nucléiques par leurs bases puriques ou pyrimidiques; elle possède une valeur quantitative, mais ne fait pas la différence entre les deux types d'acides nucléiques. Il faut lui adjoindre une méthode d'extraction ou une attaque enzymatique pour lui conférer une valeur spécifique.

Tandis que ces deux techniques caractérisent l'une le sucre, l'autre les bases au sein même de la cellule, le troisième élément, le phosphore, ne peut être identifié que par une analyse chimique comportant un fractionnement. Nous l'étudierons à la fin de ce chapitre.

Quant à l'acide RN, il peut être détecté en même temps que l'acide DRN par la spectrophotométrie ou par ses constituants phosphorés (voir ci-dessus). Mais la méthode vraiment spécifique est celle qui fait intervenir la ribonucléase, et couramment désignée sous le nom de technique de BRACHET (1940, 7). Parmi les constituants cellulaires basophiles, seule la ribonucléoprotéine perd sa colorabilité après attaque par la ribonucléase. Ainsi parvient-on à conférer une spécificité remarquable à l'action de colorants banaux, tels que le bleu de toluidine, ou de colorants déjà électifs par eux-mêmes, tels que le vert de méthyle-pyronine (mélange de UNNA).

La première et la deuxième sections de ce chapitre, seront consacrées respectivement à la recherche des acides désoxyribo et ribonucléique.

La discussion fera l'objet de la troisième section.

La quatrième section abordera l'étude du phosphore nucléique.

PREMIERE SECTION : ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE :

A) - DONNEES ANTERIEURES :

On sait depuis longtemps que les plaquettes examinées après fixation et coloration panoptique présentent un aspect finement granuleux en leur centre (chromomère ou granulomère) et clair en périphérie (hyalomère). D'où la question : les plaquettes possèdent-elles un noyau ?

Sans remonter aux recherches plus anciennes, l'apparition en 1924 (33) de la réaction de FEULGEN & ROSSENBECK offrait une possibilité de caractériser l'acide DRN : or ROSSENBECK lui-même, dans le cas des plaquettes, la trouvait négative. De même VAN CAMP, cité par VAN OYE (88).

La réaction de FEULGEN a été trouvée négative dans les plaquettes par ROSKIN & GRUNBAUM (1926, 75) - BEAMS & KING (1933,3) - CORRADETTI (1933, 22) - STORTI & STORTI (1935,79) par la technique modifiée de VON WERMEL) - ROLLA (1935, 73).

Par contre, et avec netteté, VOIT & KEMPA (1934, 89), puis VOIT (1948,90) affirment la positivité de la réaction de FEULGEN sur les plaquettes de l'homme et du cheval. Mais ils accordent que cette réaction peut apparaître négative sur les frottis de sang, où les plaquettes sont dispersées, tandis qu'une préparation concentrée étalée sous une certaine épaisseur présente une teinte rose lilas indiscutable.

Dans leurs expériences, les plaquettes sont fixées par un séjour de 24 heures dans l'alcool à 96°, et le temps d'hydrolyse par HCl normal est de 4 minutes.

GUTTMANN (1947, 41), après une revue critique des travaux antérieurs, fait part de ses observations sur les plaquettes du sang de cheval, séparées par sédimentation puis centrifugation de 3 minutes à 3.000 tours, et celles du sang humain. Les frottis, épais, sont fixés à l'acide osmique. Le temps d'hydrolyse varie de 2 à 30 minutes. Toutes les colorations de FEULGEN pratiquées ont été négatives.

A l'opposé de ces constatations, un frottis de moelle osseuse de lapin montre une coloration paradoxale des plaquettes et du cytoplasme des mégacaryocytes. L'auteur en conclut que les mégacaryocytes participent avec leur substance nucléaire à la génèse des plaquettes, et que seules les plaquettes jeunes peuvent donner la réaction de FEULGEN. Il pose le problème de la disparition ultérieure de l'acide thymonucléique: diffusion ?

transformation en acide ribonucléique ?
destruction "in situ" ?

RHEINGOLD & WISLOCKI (1948,71) dressent un tableau d'ensemble des réactions histochimiques appliquées à l'hématologie, et notent que les plaquettes ne donnent pas la réaction de FEULGEN, à la différence des corps de HOWELL-JOLLY qui sont vraiment des débris nucléaires, renfermant une désoxyribonucléoprotéine. La réaction de FEULGEN est également négative dans le cytoplasme des mégacaryocytes (qui contient par contre une ribonucléoprotéine), dans celui des hématies et dans le matériel basophile des réticulocytes.

Plus récemment CAJANO et POLOSA (1950,14) auraient obtenu, dans certains cas pathologiques une réaction de FEULGEN positive sur des plaquettes fraîchement détachées des mégacaryocytes.

Enfin la spectrophotométrie a été appliquée aux plaquettes par GUTTMANN et par RHEINGOLD & WISLOCKI (1,c) : leurs recherches d'absorption dans le maximum de 2,650 A°, caractéristique des bases puriques et pyrimidiques, ont été négatives.

B) - RECHERCHES PERSONNELLES : en l'absence de l'équipement très particulier nécessité par la méthode spectrophotométrique, nous avons utilisé les méthodes histochimiques; et notamment la réaction de FEULGEN, objet de publications contradictoires.

(a) - <u>étude des plaquettes par la réaction de FEULGEN</u> :

En appliquant à notre tour aux plaquettes la réaction de FEULGEN, nous avons tenu compte des remarques faites par les précédents auteurs. Ainsi, à l'exemple de VOIT, avons-nous étudié non seulement des plaquettes éparses sur des frottis de sang ou de moelle osseuse, mais aussi des étalements tres denses de crème plaquettaire.

Et pour vérifier les assertions de GUTTMANN, nous avons recherché des échantillons biologiques susceptibles de présenter des plaquettes jeunes (ce qui est le cas, par exemple, de la moelle osseuse des sujets qui viennent de subir une splénectomie).

TECHNIQUE : Nous avons suivi la technique classique. Voici néanmoins quelques points de détail méritant d'être précisés :

(1) Fixation : les frottis, séchés à l'air, étaient fixés :

- soit par l'alcool éthylique à 96°;
- soit par des vapeurs d'acide osmique;
- soit par un fixateur acide (FLEMING, HELLY ou BOUIN).

Il est utile de noter le type de fixateur, ainsi que la durée de son application, puisque les conditions de l'hydrolyse ultérieure, amorcée par les solutions acides, peuvent en être modifiées.

(2) Réactifs : le réactif fuchsine-sulfureux de SCHIFF, l'eau sulfureuse de lavage, l'acide chlorhydrique en solution alcoolique normale ont été préparés suivant les indications classiques (LANGERON). Ils étaient disposés pour l'emploi dans une batterie de flacons de BORREL munis de leur couvercle (3 flacons pour la solution sulfureuse de lavage). Un flacon d'HCl normal était porté à l'étuve à 60° C.

(3) Mode opératoire : hydrolyse en 2 temps :

- 1 minute en HCl normal à froid,
- puis 4 à 15 minutes en HCl normal à la température de 60° C. (temps optimum variable selon l'origine de la préparation et le mode de fixation: entre 8 et 12 minutes);

  - passage rapide à l'eau pour arrêter l'hydrolyse;
  - séjour de 90 minutes dans le réactif de SCHIFF (à la température de la pièce);
  - lavages successifs, à raison de 3 passages, de 2 minutes chacun, dans le liquide sulfureux de lavage;
  - lavage à froid à l'eau distillée;
  - déshydratation et montage au baume du Canada neutre.

(4) Interprétation : nous avons choisi des crèmes plaquettaires à un stade de purification incomplète, de manière à ce que chaque frottis renferme un certain nombre de leucocytes. Ces éléments nucléés constituant d'excellents témoins, nous n'avons retenu pour l'examen que les lames présentant une bonne différenciation des noyaux leucocytaires.

Les cellules ne prenant pas le colorant de FEULGEN étaient suffisamment reconnaissables à leur seul contour (avec l'aide éventuelle du contraste de phase) pour rendre inutile une surcoloration. D'autre part, dans chaque lot, une lame était colorée au MAY-GRUNWALD-GIEMSA à titre de contrôle.

RESULTATS : nous avons ainsi examiné :

des frottis de sang humain, normal et pathologique;
des frottis de moelle osseuse humaine et animale (lapin, cobaye, rat) (sujets normaux et sujets récemment splénectomisés);
des étalements de "tapis leucocyto-plaquettaires", provenant de sang humain citraté centrifugé;
des étalements de suspensions plaquettaires concentrées, non purifiées, mais lavées en solution physiologique pour chasser le plasma.

Sur les étalements les plus fins, aucune plaquette isolée ne donne la réaction de FEULGEN.

Sur les frottis plus épais de préparations concentrées, il apparaît une teinte rose lilas qui peut faire penser à une coloration de FEULGEN (cf.VOIT) : mais cette coloration, liée vraisemblablement à un effet de superposition des contours cellulaires, est trop pâle pour entraîner la conviction (fig. 7).

En conclusion, ni en milieu plasmatique, ni après lavage, nous n'avons obtenu de réaction de FEULGEN positive sur les plaquettes isolées ou concentrées.

(b) - étude des plaquettes par la réaction de TURCHINI :

En 1943, TURCHINI, CASTEL & KHAU VAN KIEN (83) ont présenté une nouvelle méthode de coloration nucléale, qui donne dans l'ensemble des résultats comparables à ceux de la réaction de FEULGEN. Cette méthode, où le réactif fuchsine-sulfureux est remplacé par une fluorone, qui donne une laque, permet de caractériser non seulement l'acide DRN par une coloration bleu violacé intense mais encore l'acide RN par une coloration jaune rosé (à seule condition d'appliquer un temps d'hydrolyse plus court). Elle n'a pas encore été appliquée aux plaquettes sanguines, à notre connaissance.

TECHNIQUE :

Nous avons suivi la technique des auteurs, que nous avons eu l'avantage de rencontrer personnellement.

(1) Fixation : comme pour la réaction de FEULGEN, mais le mélange de BOUIN est recommandé;

(2) Réactifs : solution alcoolique à 8 mg % de 9-phényl-2,3,7 tri-hydroxy-6, fluorone-base, acidifiée par H_2SO_4 concentré (10 gouttes officinales pour 100 ml) pH : 1 à 1,5. Ce réactif se conserve à l'obscurité et de préférence en glacière :

HCl normal en solution alcoolique (8,25 ml d'HCl de densité 1,19 pour 100 ml d'alcool à 96° - 98°) ;
batterie de flacons d'alcool à 95°, 90° et 70° ;
solution alcaline Na_2CO_3 1 %

(3) Mode opératoire : la pièce fixée est soumise à l'hydrolyse en HCl normal à la température du laboratoire. Le temps nécessaire à l'hydrolyse varie suivant les préparations et la fixation : il doit être suffisant pour que les noyaux, sur une lame témoin, prennent une coloration bleue.

Passer rapidement dans l'alcool à 90°.

Puis, dans un lieu aéré, près d'une fenêtre, verser sur la lame 35 à 40 gouttes de réactif à la fluorone : régler la ventilation de manière à ce que la solution s'évapore en 20 minutes environ. Guetter le virage au brun-orangé (la préparation fonce brusquement tandis que le restant du liquide se décolore), sans attendre la dessiccation complète : il s'est formé une véritable laque.

Laver prudemment à l'eau, puis faire virer au bleu violacé dans la solution alcaline (5 minutes) et passer en alcool à 90°; recommencer plusieurs fois ce cycle : eau - solution alcaline - alcool.

Laver à l'eau distillée, déshydrater et monter au baume du Canada neutre.

(4) interprétation : comme dans le cas de la réaction de FEULGEN, les noyaux des leucocytes présents fournissent de bons témoins de la coloration nucléale, qui doit être franchement bleue. Ce résultat est obtenu, pour les frottis fixés par contact de 20 minutes avec le liquide de BOUIN, après 10 à 12 minutes d'hydrolyse. La coloration est fidèle, et permet de noter de fins détails chromatiniens, des aspects de pycnose ou de lyse, des ombres nucléaires, etc.

RESULTATS : Nous avons examiné les préparations déjà examinées par la technique de FEULGEN, avec les mêmes résultats : isolées ou concentrées, lavées ou non, les plaquettes nous ont donné constamment une réaction de TURCHINI négative (pour ce qui est de la réaction nucléale). Le fin piqueté rose lilas, observé sur les préparations concentrées, ne peut se comparer avec la coloration franche de noyaux leucocytaires.

DEUXIEME SECTION : ACIDE RIBONUCLEIQUE

A) DONNEES ANTERIEURES : la présence d'acide RN dans les plaquettes a fait l'objet d'études récentes, en particulier par la technique de BRACHET. On sait que la ribonucléase a pour effet de détruire électivement la basophilie des parties de la cellule qui renferment de l'acide RN. Tandis que son action est positive sur le cytoplasme et les nucléoles des cellules médullaires jeunes, et sur le cytoplasme des lymphocytes, elle s'est révélée négative sur les plaquettes.

Selon VAN OYE (1948, 88) après 2 heures d'attaque à 60° par la ribonucléase, les plaquettes conservent intactes leurs propriétés de coloration.

RHEINGOLD & WISLOCKI (l.c) n'ont pas réussi à déceler un acide RN dans les plaquettes, ni par l'action de la ribonucléase, ni par la méthode photométrique de DEMPSEY, SINGER & WISLOCKI (1946), qui mesure la colorabilité des éléments tissulaires aux diverses valeurs du pH. Par contre, le cytoplasme des mégacaryocytes éprouvé par ces deux méthodes, contient une ribonucléoprotéine.

En dehors de ces deux techniques qui s'appliquent particulièrement à l'acide RN, rappelons que les plaquettes n'absorbent pas les rayons ultra-violets dans une bande élective voisine de 2.600 A° (GUTTMANN; RHEINGOLD & WISLOCKI) : ce caractère négatif, déjà signalé à propos de l'acide DRN, vaut également pour l'acide RN.

B) RECHERCHES PERSONNELLES :

(a) - Matériel étudié : nous avons étudié : des frottis de sang humain normal;
- des préparations enrichies en leucocytes et en plaquettes;
- des crèmes plaquettaires concentrées.

(b) Technique : apres fixation par le liquide de SUSA, nous avons utilisé tantôt le bleu de toluidine et tantôt le mélange de UNNA (vert de méthyle-pyronine), en y associant l'attaque par la ribonucléase (méthode de BRACHET).

1) - le bleu de toluidine a été préparé suivant le conseil de PANIJEL (67) par saturation de l'eau distillée. Après 20 minutes de coloration à la température du laboratoire, on différenciait rapidement par l'alcool à 95°;

2) - en ce qui concerne le vert de méthyle-pyronine, nous ne mentionnerons que pour mémoire les difficultés techniques inhérentes à son emploi. Nous avons essayé successivement :

- des mélanges commerciaux (Ciba, Geigy),
- et des mélanges préparés par nous-mêmes selon la formule classique (0g,25 de vert de méthyle, 0g,15 de pyronine pour 100 ml) et selon la formule plus concentrée de WHITE (vert de méthyle : 0,3 - pyronine; 0,7 g pour 100 ml).

Le vert de méthyle utilisé (Grübler) avait été soigneusement lavé au chloroforme pour éliminer le violet de méthyle qui constitue une impureté.

Les lames étaient colorées 1 heure à 60° C., ou 24 heures à la température du laboratoire, puis lavées à l'eau distillée, différenciées par l'alcool à 95°, déshydratées et montées au baume.

3) - la ribonucléase dont nous disposions était un produit cristallisé, très actif, que nous avons dissous à raison de 1 mg par ml d'une solution tampon de MICHAELIS au pH de 6,85. La même solution tampon, sans ribonucléase, servait de témoin, sur une partie de la lame isolée par un double trait de crayon gras. Après 1 heure à 60° C., la lame était lavée puis colorée.

(c) - Résultats :

1) - par le bleu de toluidine seul, les plaquettes prennent une teinte d'un bleu franc pour ce qui est du hyalomère, sur lequel se détachent de fines granulations azurophiles (aspect tigré). Cette coloration n'est pas modifiée par l'action de la ribonucléase, tandis que la basophilie cytoplasmique des lymphocytes présents sur la lame disparaît dans ces conditions;

2) - par le vert de méthyle-pyronine, les plaquettes sont faiblement colorées en rose pâle. Elles présentent le même aspect après l'attaque par la ribonucléase, cependant que les lymphocytes (dont le noyau reste coloré en bleu-vert) ont perdu la pyronophilie intense de leur sertissure cytoplasmique.

Notons à cette occasion que la non-coloration par le vert de méthyle constitue un argument supplémentaire en faveur de l'absence de substance nucléaire histologiquement décelable dans les plaquettes.

Ainsi l'application aux plaquettes sanguines de l'homme de la méthode de BRACHET permet de conclure à l'absence de ribonucléoprotéine, histochimiquement décelable par son acide RN dans les conditions de notre étude.

TROISIEME SECTION : DISCUSSION :

A) SPECIFICITE DES METHODES EMPLOYEES : Nous ne ferons qu'évoquer les critiques adressées à la réaction de FEULGEN par des auteurs tels que STEDMAN & STEDMAN, DANIELLI, CARR. Leurs objections portaient tant sur le mécanisme de l'hydrolyse que sur la validité du réactif de SCHIFF en tant que réactif aldéhydique. Elles ont été brillamment réfutées par BRACHET (1946, 8), démontrant que la désoxyribonucléase supprime électivement la coloration de FEULGEN, ainsi que par DI STEFANO. La spécificité de la réaction de FEULGEN peut être considérée actuellement comme sérieusement établie (PANIJEL).

La réaction nucléale de TURCHINI, moins répandue que la réaction de FEULGEN, semble pouvoir bénéficier de la même opinion favorable, compte-tenu du principe de l'hydrolyse préalable qui rapproche ces deux réactions.

Devant les résultats négatifs de ces colorations nucléales, nous avons renoncé à étudier systématiquement l'action d'une désoxyribonucléase, dont l'emploi n'apparaissait pas justifié.

Quant au traitement par la ribonucléase, il acquiert par la spécificité de l'attaque enzymatique, dans les conditions optima de température et de pH, une valeur qui n'est pas contestée.

B) VALIDITE DES RESULTATS OBTENUS : Nos observations s'accordent, en ce qui concerne l'acide ribonucléique, avec les rares données existantes, et pour ce qui touche la réaction de FEULGEN, avec celles de la majorité des auteurs. Nous avons bien constaté, comme VOIT & KEMPA, que les préparations de plaquettes concentrées, soumises à la réaction de FEULGEN, prennent une teinte d'ensemble rosée, parfois même violine, qui peut donner le change. Mais nous pensons qu'il s'agit là d'un artefact optique, lié à l'épaisseur de la préparation, et non d'une réaction de FEULGEN positive.

Nous avons tenté de vérifier par ailleurs les assertions de GUTTMANN, en nous plaçant dans les conditions signalées par cet auteur comme les plus favorables à l'observation d'éléments jeunes : or l'examen des frottis médullaires de sujets splénectomisés, renfermant par hypothèse des plaquettes de formation récente (ainsi qu'en témoignaient les "images de WRIGHT" rencontrées), est demeuré négatif.

Il reste que nos arguments, en ce qui concerne l'acide DRN, sont d'ordre négatif, et que la spécificité reconnue aux réactions de FEULGEN et de TURCHINI n'impliquent pas que celles-ci soient obligatoirement positives dans les cas où n'existent que des traces de substance nucléaire. Il s'agit de méthodes indirectes, dont la sensibilité peut être mise en défaut. Pourtant il convient de reconnaître que la spectrophotométrie dans l'ultraviolet, méthode directe, sensible et quantitative, ne révèle aucun acide nucléique (GUTTMANN).

En admettant que les plaquettes possèdent une désoxyribonucléase (ce qui est du domaine de la pure hypothèse), la destruction de l'acide DRN par une attaque enzymatique, au sortir de l'organisme, est peu probable, car aucune substance nucléaire n'est mise en évidence sur des frottis de sang frais, fixés immédiatement.

Quant à la transformation "in situ" de l'acide DRN en acide RN (possibilité invoquée par certains auteurs), au cours de l'évolution des plaquettes, elle n'est pas à retenir, puisque les plaquettes ne renferment pas non plus d'acide RN.

La détection de l'acide ribonucléique par la méthode de BRACHET est passible des mêmes remarques que l'identification histochimique de l'acide DRN, sur le plan de la sensibilité. Là encore les techniques photométriques quantitatives fournissent des recoupements précieux, et ses données concordent avec celles de l'histochimie.

En conclusion de nos essais, les plaquettes sanguines de l'homme ne renferment pas d'acides nucléiques décelables par les méthodes histochimiques.

QUATRIEME SECTION : RECHERCHE DES ACIDES NUCLEIQUES (ou de leurs composants) PAR L'ANALYSE CHIMIQUE. :

A) DONNEES ANTERIEURES :

Les bases puriques ont été recherchées, comme témoin de l'existence dans les plaquettes d'une substance nucléaire.

Dès 1906, SCHITTENHELM & BODONG démontraient la présence de corps puriques dans les plaquettes.

En 1936, ROHR & KOLLER (72) ont appliqué concurremment la microméthode de G. SCHMIDT et la détermination quantitative de l'N purique et de l'N total aux plaquettes de l'homme et à celles du veau.

La séparation était effectuée à partir de petites quantités de sang, par centrifugation fractionnée, sous contrôle microscopique, jusqu'à ce que la contamination par hématies ou leucocytes devienne négligeable.

Le rapport N purique / N total : (quotient purique) s'établissait en moyenne à 3, 3 % pour les plaquettes de veau
à 4 % pour les plaquettes humaines.

En comparaison, le même rapport était :

pour les globules rouges humains..... de 0,24 à 0,31 %
" " " " de veau..... de 0,12 à 0,26 %
" " " "d'oiseau(nucléés)de 3,19 à 3,88 %
pour le thymus de veau..... de 1? %
pour la moelle osseuse rouge (homme).. de 3,8 %
pour le rein humain..... ..... de ?,88 %

Les auteurs concluent à la présence indubitable de corps puriques, donc de substance nucléaire, dans les plaquettes, mais celles-ci ne se composent pas exclusivement de substance nucléaire.

WAGNER (1946,91) semble le seul auteur à fournir des indications sur la présence de phosphore nucléique dans les plaquettes. Sur un échantillon de 9 mg de plaquettes sèches, obtenues à partir du sang de cheval par centrifugation fractionnée (selon la méthode de GABBE modifiée par CHARGAFF), il trouve 0,0285 mg de P total, dont 0,0282 mg de P nucléique. Le test de BIAL sur l'hydrolysat acide permet de caractériser le pentose.

WAGNER obtient le même résultat sur les plaquettes fraîches du sang humain.

B) RECHERCHES PERSONNELLES :

La recherche du P nucléique apparaissait d'emblée comme un élément essentiel de l'étude du noyau plaquettaire.

Nous avons choisi pour l'effectuer, sur des échantillons frais et des échantillons desséchés, la méthode de SCHNEIDER (1945,76). On sépare les acides nucléiques par chauffage de l'échantillon avec une solution à 5 % d'acide trichloracétique, après élimination des phospholipides et des composés phosphorés acido-solubles à froid. Des réactions colorées permettent ensuite de caractériser les sucres. Eventuellement, la photométrie donne une indication sur la présence des bases.

Une première série de fractionnements et de dosages a été effectuée dans la Section de physiologie et biochimie de l'Institut des Recherches sur le Cancer (laboratoire dirigé par Melle LE BRETON), sur des échantillons de plaquettes recueillies en alcool absolu : elle décelait des traces de P nucléique.

De nouveaux essais, pratiqués dans le même laboratoire, sur des échantillons de plaquettes fraîches, homogénéisés à l'appareil de POTTER, ont révélé l'absence totale, ou de faibles traces de P nucléique (à la limite des erreurs de lecture) :

	S 4	S 5	S 6
Poids de l'échantillon frais (environ)...	1g,5	1g,5	1g,35
Poids sec/poids frais.....	10,9 %	15,6 %	14,8 %
N total (Kjeldahl).....	11,7 %	11,6 %	11 %
P acidosoluble (pour 100 g de poids sec).	600 mg	800 mg	.....
" " (pour 1 g d'azote).....	51,5 mg	68,9 mg	.....
P lipidique (pour 100 g de poids sec)....	590 mg	276 mg	.....
" " (pour 1 g d'azote).....	50,5 mg	23,6 mg	.....
P nucléique.....	traces	zéro	traces

Une dernière série de recherches, entreprise au laboratoire de Chimie de l'E.C.R.T.A., a porté sur des échantillons desséchés (ce qui facilitait l'homogénéisation). Le phosphore était dosé, comme précédemment, par la méthode colorimétrique de MACHEBOEUF & DELSAL (1943, 57). Trois essais successifs nous ont confirmé l'absence totale de P dans la fraction nucléique des plaquettes.

Voici le protocole de l'expérience la plus complète :

Prise d'essai.....	0g,13 (échantillon sec).
N total (Kjeldahl).....	10g,2 pour 100 g de poids sec.
P total.....	1,25 " " " " "
P acidosoluble (pour 100 g de poids sec).....	770 mg
" " (pour 1 g d'azote)....	75,1
P lipidique (pour 100 g de poids sec).....	670 mg
" " (pour 1 g d'azote).....	65,7
P nucléique.....	zéro
P protéique.....	traces

Notons que la valeur du P total a été déterminée sur plusieurs échantillons secs, donnant respectivement 1 g,24, 0g,98 et 1g,25 pour 100 g de poids sec. (moyenne 1g,15).

A titre de comparaison, nous avons trouvé, sur un échantillon de crème leucocytaire, la valeur de 28 mg de P nucléique pour 100 g de poids frais, (soit approximativement 250 mg pour 100 g de poids sec), et sur un échantillon de poudre leucocytaire 293 mg pour 100 g de poids sec, par la même méthode de SCHNEIDER.

La valeur du P total de ce dernier échantillon de leucocytes était de 600 mg pour 100 g de poids sec (une seule détermination).

Nous avons cherché à caractériser le sucre, à deux reprises, dans la fraction nucléique des plaquettes (après fractionnement selon SCHNEIDER). Les valeurs de ribose trouvées par la méthode à l'orcine (BROWN,1946, 16) étaient de l'ordre de 2 gammas (en P) par ml de la prise

d'essai. Leur traduction en acide ribonucléique donne des chiffres deux fois supérieurs à ceux qu'exprime le dosage direct du P nucléique. A titre indicatif, la fraction nucléique renfermerait 5 mg de ribose, la fraction acido-soluble 119 mg de ribose pour 100 g de poids frais.

Un seul essai d'absorption au voisinage de 2.600 A° a été tenté selon la méthode d'OGUR & ROSEN (1950, 62) avec lecture au BECKMAN, sur un extrait nucléique de plaquettes : il a été strictement négatif. Il est vrai que cette méthode s'applique surtout aux éléments végétaux tels que les germes de blé.

En conclusion, les plaquettes examinées par la méthode de SCHNEIDER ne montrent que des traces (à la limite des erreurs de lecture), ou une absence totale de phosphore nucléique (Note 6).

Note 6 : Nous n'avons pas pratiqué, comme ROHR & KOLLER, le dosage des bases puriques et pyrimidiques sur les plaquettes totales, cette recherche n'ayant de valeur que liée à un fractionnement.

CHAPITRE II

ANALYSE CHIMIQUE DES PLAQUETTES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:

La composition chimique des plaquettes est moins connue que celle des autres éléments figurés du sang. Encore les travaux publiés portent-ils sur un matériel trop peu important ou insuffisamment purifié, et le plus souvent d'origine animale (cheval, chien). L'étude chimique des plaquettes sanguines de l'homme apparaît donc largement motivée.

En dehors des premiers essais d'HAUROWITZ et SLADEK, que nous citerons à propos des éléments minéraux, il n'existe pas d'étude d'ensemble de la composition chimique des plaquettes.

Nous envisagerons successivement :

- I) éléments minéraux
- 2) lipides
- 3) protides
- 4) autres constituants (phosphore nucléique et purines mis à part)

et mentionnerons pour chaque série les travaux antérieurs.

I°) - COMPOSITION MINERALE DES PLAQUETTES :

A) DONNEES ANTERIEURES :

HAUROWITZ & SLADEK (1928,43) ont étudié la composition chimique des plaquettes du sang de cheval : partant de 10 litres de sang recueilli sur solution citratée, ils obtiennent par sédimentation spontanée suivie de plusieurs centrifugations une préparation ne contenant pas plus d'un leucocyte pour 2.000 plaquettes. Le plasma a été éliminé par lavage en solution saline isotonique, à l'occasion de chaque centrifugation.

Voici un de leurs protocoles : 0g,0868 de substance sèche (dessication au four à 110°) donnent : 9,82 mg d'azote protéinique (Kjeldahl), soit 61,4mg d'albumine (note 7);

Note 7 : Le terme d'albumine a certainement été employé par ces auteurs pour désigner l'ensemble des protéines, ce qui actuellement ne serait plus correct.

- 10,2 mg de substances éthéro-solubles, dont 1,5 mg de cholestérine (colorimétrie);

- 4,8 mg de cendres dont 0,064 mg de Ca (= 0,32 cc. de K Mn O_4 n/100 titrage d'après CLARK).

Au total, 10 litres de sang de cheval ont fourni 0g,434 de substance plaquettaire sèche : les résultats comparatifs s'expriment dans le tableau suivant :

	Plaquettes	Leucocytes
albumines (note 7).....	71 %	69 %
lipoïdes.....	12	22
dont cholestérine.....	1,7	7,4
cendres.....	5,5	1,84
dont Ca.....	0,074	0,04

Les stromas des globules rouges se distinguent des plaquettes par leur richesse en protéines et leur moindre teneur en substances éthérosolubles.

ENDRES & HERGET (1929,28) ont traité, par lots de 10 litres, 480 litres de sang de cheval pour déterminer la composition minérale des plaquettes. Le liquide anticoagulant varie suivant qu'ils se proposent de titrer le K (oxalate de sodium à 1,3 %), le Na (oxalate d'ammonium à 1,46 %), ou le Ca (citrate de sodium à 3,8 %). La séparation est effectuée par une sédimentation suivie de centrifugations répétées et prolongées (jusqu'à 8 et 10 heures à 3.000 tours).

La faible contamination des plaquettes par des leucocytes a dû être prise en considération "puisqu'il n'existe jusqu'à présent aucun procédé qui permette de séparer complètement les plaquettes des globules blancs". Un excès de centrifugation entraîne en effet de telles détériorations cellulaires que le liquide de lavage est laiteux et la diffusion d'électrolytes certaine.

Le poids sec est mesuré dans une capsule de platine maintenue à 90° jusqu'à poids constant.

Le poids spécifique et le volume sont appréciés à l'aide d'une pipette à centrifuger de forme spéciale.

Voici quelques données comparatives sur les éléments figurés du sang de cheval :

	Plasma	Hématies	Leucocytes	Plaquettes
poids spécifique.....	1,0285	1,085	1,058	1,054
cendres (pour 100g).....	9,6	7,3	5,7	5,7

La composition minérale des plaquettes est très voisine de celle des globules blancs, différente de celle des globules rouges et du sérum. Elles contiennent beaucoup moins de Na et de Ca, beaucoup plus de K que le sérum. En pourcentage, elles sont relativement riches en ion PO_4, pauvres en HCO_3.

B) RECHERCHES PERSONNELLES :

Nous avons tenté de caractériser et de doser certains éléments minéraux par étude des cendres au spectrographe d'émission (dans les laboratoires du Centre National de Recherche Agronomique, à Versailles). L'examen portait sur des échantillons de plaquettes très purs et lyophilisés, présentation qui avait l'avantage de fournir d'emblée un matériel stable et de poids sec connu (note 8).

(a) Technique : I° - avant d'être desséchées par lyophilisation, les plaquettes avaient été lavées avec soin dans des solutions salines préparées avec une eau bidistillée :

-solution de NaCl 8,5 pour mille (pour la détermination des électrolytes autres que le sodium);
-solution de KCl 11,5 pour mille (pour la détermination du sodium);
-solution de glucose 50 pour mille (pour contrôle).

Pour reconnaître une contamination possible par un électrolyte étranger des témoins de chaque solution de lavage ont été examinés au spectrographe.

Chaque lot de plaquettes a été soumis à une calcination aussi complète que possible.

2° - Le spectrographe utilisé est le grand spectrographe de FERRY : on a l'avantage d'y photographier les focales de la fente, et non ses images, ce qui élimine les erreurs dues à la variation en hauteur des images de l'arc.

la fente du spectrographe est ouverte à 3/100 de mm.

La source lumineuse est l'arc électrique horizontal alimenté en courant continu de 8 à 10 ampères et jaillissant entre 2 charbons. Bien qu'obtenant ainsi un fond continu plus dense qu'en courant alternatif, on a l'avantage d'avoir une stabilité beaucoup plus grande.

Note 8 : Sous réserve d'une légère réhydratation au contact de l'air ambiant, d'où augmentation du poids qu'il est nécessaire de corriger quand le taux d'humidité de l'échantillon excède 1 %.

Pour avoir toujours la même position des charbons, on projette leur image sur un écran fixe, et on règle leur écartement de façon à ce que leur image coïncide avec deux repères fixes tracés sur cet écran. On est alors certain d'obtenir sur la fente du spectrographe l'image du même point de l'arc. Ceci est essentiel étant donné les variations de l'intensité lumineuse émise lorsque l'on passe du cratère négatif au cratère positif de l'arc.

Un échantillon de cendres, de poids connu, est déposé à l'intérieur de la cathode de charbon, préalablement creusée d'un orifice de 3 mm. de diamètre et de 4 mm. de profondeur.

On fait jaillir l'arc pendant 10 minutes, sous une intensité de 10 ampères, ce qui assure une combustion totale.

L'allumage se fait au moyen du dispositif indiqué par D.BERTRAND, la fente du spectrographe étant ouverte.

Le film utilisé est un film Kodak positif qui posséde une bonne sensibilité, tout en donnant un fond continu faible. On le développe à l'aide d'un révélateur Rhodol - Hydroquinone dilué au 1/10 pendant 3 minutes à 18° C.

3° - La lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre. La courbe d'étalonnage se trace en utilisant des solutions contenant les constituants minéraux déjà identifiés dans les plaquettes, en quantités connues.

b) - Résultats :

Expérience n° 1 : qualitative (juillet 1951) : on trouve Ca, Mg, Mn, P, K, Na... plus des traces de Cu et d'Al. La présence de Fe n'était pas certaine.

Expérience n° 2 : novembre 1951 : prise d'essai : 0g270 (poids sec); cendres à 300° : 0g,026, soit 9,6 % du poids sec.

Composition minérale des cendres :

Na	21 pour mille,	soit 0,22 % du poids sec
K	3 pour mille,	soit 0,031 % du poids sec
Ca	9 pour mille,	soit 0,093 % du poids sec
Mg	1,5 pour mille,	soit 0,0153 % du poids sec
Cu	0,1 pour mille,	soit 0,00102 % du poids sec
Fe	0,05 pour mille,	soit 0,00052 % du poids sec
Mn	0,01 pour mille,	soit 0,0001 % du poids sec

Expérience n° 3 : juin 1952 : les résultats se comparent à ceux de l'essai précédent, avec un doute au sujet du Zn (élément qui a été caractérisé au

sein des leucocytes par VALLEE (1949), opérant avec un spectrographe à réseau) : les raies du Zn sont en effet très voisines de celles du sodium, ce qui rend leur détermination très difficile.

Expérience n° 4 : septembre 1952 : prise d'essai 0g,323 (plaquettes lyophilisées)

- poids sec : 0g,310
- cendres à 400° : 0g,025 (la calcination a été plus poussée que dans les essais précédents).

Composition minérale des cendres :

Na (note 9): 30 pour mille, soit 0,242 % du poids sec.
K non dosé dans cette expérience, les plaquettes ayant été lavées en solution de K Cl;
Ca (note 9) 12 pour mille, soit 0,097 % du poids sec
Mg 2,5 pour mille, soit 0,02 % du poids sec
Cu 0,15 pour mille, soit 0,012 % du poids sec
Fe 0,08 pour mille, soit 0,00065 % du poids sec
Mn 0,02 pour mille, soit 0,00016 % du poids sec

Cette fois l'absence du Zn est certaine, pour autant que l'on puisse l'affirmer. Il n'y a donc pas eu de contamination d'origine leucocytaire.

Les valeurs obtenues pour les éléments dosés sont légèrement supérieures à celles que donnaient les expériences précédentes : nous les tiendrons pour plus exactes, en raison de la meilleure calcination.

En définitive, nous proposons pour les métaux étudiés par la spectrographie d'émission, les valeurs suivantes :

(Na (3 essais) : 0,24 % du poids sec (0,288 pour ENDRES & HERGET)
(K (2 ") : 0,031 % " " (0,07 " " ")
(Ca (3 ") : 0,096 % " " (0,009 " " ")
(. . . . . (0,074 pour HAUROWITZ & SLADEK)
(Mg (3 essais) : 0,02 %
(Cu (3 ") : 0,012 %
(Fe (3 ") : 0,00065 % du poids sec (0,0007 pour ENDRES & HERGET)
(Mn (3 ") : 0,00016 %

Note 9 : ces derniers résultats ont été contrôlés au photomètre de flamme.

2°) - LIPIDES PLAQUETTAIRES :

A) - DONNEES ANTERIEURES :

CHARGAFF, BANCROFT & STANLEY-BROWN (1936, 16) étudiant les substances thromboplastiques, présentent une première analyse chimique systématique des lipides plaquettaires. Un sang de cheval oxalaté est soumis à une sédimentation spontanée, puis à des centrifugations répétées : après 6 à 9 lavages (en solution citratée puis en solution isotonique de Na Cl), le taux des leucocytes n'excède pas 1 pour 3.000 à 4.000 plaquettes. La préparation a demandé 48 heures.

L'extraction est faite par un mélange à volumes égaux d'alcool absolu et d'éther (sans peroxyde) pendant 21 jours à la température du laboratoire, à l'obscurité et en atmosphère d'azote. Après filtration, une nouvelle extraction par le chloroforme est effectuée (en 21 jours).

Deux lots de 472 et 493 mg (poids sec) ont été ainsi analysés:

	Lot I		Lot II	
	mg	% du poids sec	mg	% du poids sec
Lipides solubles dans l'alcool-éther	34,3	7,3 %	82,6	16,8 %
Lipides solubles dans le chloroforme	7,1	1,5	1,2	0,2
Phosphatides (insolubles dans l'acétone)	17,5	3,7	59,1	12,0
Lécithine	10,4	2,2	34,9	7,1
Céphaline	5,5	1,2	23,3	4,7
Fraction acétono-soluble.....	16,6	3,5	22,6	4,6
Cholestérol.....	8,7	1,8	13,9	2,8
Plaquettes délipidées.....	431,3	91,2	408,7	83,0

Les auteurs concluent à la richesse des plaquettes en phosphatides et en cholestérol, et à leur pauvreté en glycérides.

ERICKSON, WILLIAMS, AVRIN & LEE (1939,29) ont trouvé, dans les plaquettes de l'homme adulte normal (pour un groupe de 25 adultes) et par des méthodes microgazométriques :

Lipides totaux.....	16 %	du poids	sec
Phospholipides.....	12 %	"	"
Cholestérol libre.....	2 %	"	"
Cholestérol estérifié.....	1 %	"	"
graisses neutres.....	1 %	"	"

La céphaline représente 68 % des lipides totaux.

Les plaquettes d'enfants normaux (pour un groupe de 9 enfants) contiennent moins de phospholipides que celles des adultes.

Chez un malade atteint de purpura thrombopénique, dans la phase de stimulation qui fait suite à la splénectomie, la teneur en lipides a été trouvée normale.

Les auteurs soulignent l'analogie, dans leur composition lipidique, des plaquettes, leucocytes, érythrocytes, et du stroma érythrocytaire chez l'homme.

Dans un extrait aqueux de plaquettes préparées par broyage de plaquettes en solution saline isotonique, WARE, FAHEY & SEEGERS (1948,93) ont identifié :

- une céphaline (thromboplastine),
- et deux accélérateurs de la coagulation, de nature vraisemblablement protéique.

BLOOM & WISLOCKI (1950,6) ont appliqué aux plaquettes deux méthodes de localisation histochimique des lipides :

I) le noir Soudan B ne révèle pas de granules soudanophiles dans les plaquettes humaines, alors qu'il fait apparaître de nombreux granules très fins, gris ou noirs, dans le cytoplasme des mégacaryocytes;

2) le test à l'hématéine de BAKER (spécifique des phosphatides lorsqu'il est associé à un test d'extraction par la pyridine négatif) donne une coloration grise diffuse des plaquettes, avec quelques granulations d'aspect grossier, plus sombres - et révèle dans les mégacaryocytes des structures plus fines.

B) - RECHERCHES PERSONNELLES : Elles ont été poursuivies à l'Institut des recherches sur le Cancer (Section de Physiologie et de Biochimie, dirigée par Melle LE BRETON).

Les lipides ont d'abord été étudiés sur des échantillons de plaquettes pures, dont un poids connu était recueilli sur de l'alcool éthylique. Après un long séjour en glacière, les lipides totaux étaient extraits au Kumagawa selon la technique de LEMELAND (1923,54). Le cholestérol était dosé par la méthode pondérale de WINDAUS, modifiée par CAMINADE (1922,15).

Voici les résultats exprimés par rapport au gramme de poids frais :

Ière série : un mélange de 4 extraits alcooliques, représentant au total 8,07 g de crème plaquettaire (pesés en Erlenmeyer rodé et bouché), a donné :

- en acides gras phosphatidiques : 13,87 mg par g de poids frais
- en acides gras de graisses neutres : traces
- en cholestérol libre..... : 4,3 mg par g de poids frais
- en cholestérol estérifié..... : 0,9 mg par g de poids frais

2ème série : sur des préparations analogues, et sur des plaquettes fraîches, on trouve :

- en acides gras phosphatidiques (4 dosages) : 13 mg par g de poids frais
  10,9 " " " "
  9,7 " " " "
  12 " " " "
- en lécithine : une quantité difficilement dosable (environ 1 mg);
- en acides gras de graisses neutres : une quantité difficilement dosable(1 à 2 mg)
- en cholestérol libre..... 4,3 mg par g de poids frais
- en cholestérol estérifié..... ..... 0,9 " " " "

On ne relève pas de différences sensibles entre les dosages effectués sur les échantillons en alcool et les dosages sur plaquettes fraîches.

3ème série : à partir d'un échantillon de plaquettes fraîches pesant 3 g (poids sec : 12,9 % du poids frais), l'extrait lipidique total est de 30,7 mg par g de poids frais, soit 23,8 % du poids sec;

- acides gras phosphatidiques : 13,2 % du poids sec,
  soit : phosphatides : 18,5 % du poids sec;

- acides gras de graisses neutres : 1,16 % du poids sec,
  soit : graisses neutres : 1,23 % du poids sec;

- cholestérol libre..... 3,1 % du poids sec;
- cholestérol estérifié..... 0,7 % du poids sec.

Bien que le poids sec n'ait pas été déterminé pour tous ces échantillons, il est possible de rapporter les valeurs obtenues au gramme de substance sèche, avec une approximation de 10 %. Le poids sec représente en effet, pour des suspensions plaquettaires concentrées dans les conditions de l'expérience, environ 13 % du poids frais (± 10 %).

Ceci nous permet d'établir une comparaison avec les chiffres donnés par les autres auteurs, en pourcentage du poids sec :

- phosphatides (les 7/5 du poids des acides gras phosphatidiques) :

14,98 - 14,04 - 11,77 - 10,48 - 12,96 et 18,50 %, soit en moyenne,

sur 6 essais..... 13,8 % du poids sec.

cf. CHARGAFF : 3,7 % et 12 %
ERICKSON : 12 %

- graisses neutres : de l'ordre de 1 % (avec un chiffre plus précis de 1,23 %).

cf. CHARGAFF : 1,5 et 0,2 %
ERICKSON : 1 %

- lécithine :....., de l'ordre de 1 %

cf. CHARGAFF: 2,2 et 7,1 %

- cholestérol libre : 3,31 - 3,31 et 3,1 %

cf. CHARGAFF : 1,8 et 2,8 % (pour l'ensemble du cholestérol);
HAUROWITZ & SLADEK : 1,5 % (pour l'ensemble du cholestérol);
ERICKSON : 2 % (cholestérol libre)

- cholestérol estérifié : 0,69 - 0,69 et 0,7 %

cf. ERICKSON : 1 %

Si nous exceptons la lécithine (pour laquelle CHARGAFF apporte des valeurs plus élevées que les nôtres, et d'ailleurs divergentes entre elles), nos résultats sont du même ordre que ceux des précédents auteurs (note 10) Rappelons que les chiffres de CHARGAFF concernent les plaquettes du cheval, les données d'ERICKSON celles de l'homme.

Le cholestérol libre est en quantité notablement supérieure au cholestérol estérifié, contrairement à ce qui est constaté dans la plupart des tissus (où le cholestérol libre représente 2 à 10 % du cholestérol estérifié) et dans le sérum (où leur rapport est voisin de 50 %) : (PANTALEON - 1944,68).

Bien que nous n'ayons pas caractérisé directement la céphaline, sa prédominance apparaît probable, puisque la lécithine compte pour 7 % seulement de la totalité des phosphatides, d'après nos dosages. Ce point mériterait d'être précisé, en raison de l'importance longtemps attribuée à des substances du type de la céphaline dans la constitution de la thromboplastine.

Note 10 : Nous ne pouvons les soumettre à l'analyse statistique, le petit nombre de mesures publiées par ces auteurs ne permettant pas de calculer l'erreur standard. Dans nos propres mesures celle-ci peut être estimée à 2,8 (mais il faut tenir compte des réserves mentionnées dans la page précédente).

Les concordances des mesures du cholestérol sont excellentes.

Les systèmes enzymatiques liés au métabolisme des lipides seront étudiés dans la troisième partie de ce travail : signalons dès maintenant, pour assurer l'homogénéité du chapitre des lipides, que nous avons reconnu aux plaquettes une activité lécithasique faible, tandis que la recherche de la désaturase a été négative.

3°) - PROTIDES PLAQUETTAIRES :

A) - DONNEES ANTERIEURES :

Il n'existe pas jusqu'à présent de données bien établies sur la nature et l'importance des protides plaquettaires.

Seuls en effet, HAUROWITZ et SLADEK, en 1928 (43), mentionnent dans les plaquettes du sang de cheval l'existence d'albumines (dans le sens probable de "protéines totales"), à raison de 71 % du poids sec.

Et HORANYI (1949, 47) croit pouvoir affirmer que les euglobulines du plasma dérivent des plaquettes.

B) - RECHERCHES PERSONNELLES :

Nous avons adopté le plan de travail suivant :

a) - dosage de l'azote total et de l'azote protéique par la méthode de Kjeldahl, sans fractionnement préalable, sur des échantillons de plaquettes fraîches et des produits desséchés;

b) - mêmes déterminations sur les produits solubles obtenus par une lyse prudente d'une crème ou d'une poudre plaquettaire, et sur le résidu insoluble dans l'eau;

c) - étude électrophorétique du lysat.

Voici nos résultats :

a) - dosages d'azote sur le produit brut

1°) à partir d'une crème plaquettaire concentrée :

	N total dans l'échantillon	N total en % du poids sec	N protéinique dans l'échantillon	Protides totaux (en % du poids sec)
Echantillon T 2:	12,3 mg	9,45 %	11,7 mg	56 %
" S 4:	.....	11,7 %	.....	....
" S 5:	.....	11,6 %	.....	....
" S 6:	.....	11,	.....	....

2°) à partir d'une poudre de plaquettes :

	N total dans l'échantillon	N total en % du poids sec	N protéinique dans l'échantillon	Protides totaux (en % du poids sec)
Echantillon T 3 :	23,1 mg	11,55 %	19,1 mg	59,5 %
" T 7 :	18,55 mg	9,27 %	17,21 mg	53,7 %
" S 8 :	5,72 mg	9,8 %	4,81 mg	51,8 %
" T 11:	46,9 mg	9,38 %	39,3 mg	49,1 %
" T 14:	10,85 mg	10,85 %	10 mg	62,5 %
" T 15:	24,5 mg	12,25 %	20,2 mg	63,1 %
" T 16:	12,25 mg	10,1 %	11,4 mg	59,3 %

Ainsi les plaquettes renferment en moyenne 11 % d'azote total et 9,12 % d'azote protéinique (note 11), soit 57 % de leur poids en protides totaux (note 12).

3°) avec discrimination des constituants azotés, par la méthode du double azote de CRISTOL (1929,23) : pour 1,60 g (environ) de crème plaquettaire, nous trouvons par gramme de substance fraîche :

N total..... 53,2 mg (n)
N trichloroacétique..... 5,2 mg (a)
N phosphotungstique..... 4,6 mg (p)

Nous pouvons en déduire les valeurs suivantes :

- pour l'azote protéique..... n - a = 48 mg
  soit en protéines..... 304 mg

- pour l'azote polypeptidique : a - p = 0,6 mg

L'azote polypeptidique est donc peu important.

Note 11 : L'analyse statistique, sur 11 mesures de l'N total par la méthode de KJELDAHL, nous donne une erreur standard de 1,08 (soit 10 % de la valeur moyenne);

sur 8 mesures de l'N protéique par la même méthode, une erreur standard de 0,8 (soit 9 % de la valeur moyenne).

Note 12 : Si l'on admet le coefficient arbitraire x 6,25 : coefficient qui ne s'applique pas uniformément à toutes les protéines et qui devrait être majoré dans le cas des protéines les plus complexes telles que les lipoprotéines.

b) - dosages d'azote sur le lysat plaquettaire et le résidu insoluble:

Nous avons rencontré d'emblée de grandes difficultés dans l'obtention d'un lysat plaquettaire limpide. Si l'on broie en effet les plaquettes avec de la poudre de verre, en présence d'une eau distillée refroidie, une centrifugation de 20 minutes à 2.300 G fournit un surnageant lactescent. La turbidité, est toujours importante, que l'on opère sur des produits frais ou sur des plaquettes lyophilisées. Seuls des détergents agressifs à l'égard des protéines, tels que le lauryl-sulfate de sodium, permettaient d'obtenir un éclaircissement relatif.

Une lyse par ultra-sons (réalisée dans le laboratoire de M. GRABAR, à l'Institut Pasteur) nous a fourni également un produit trouble, impropre à l'électrophorèse.

Mais nous avons pu obtenir tout récemment un liquide surnageant parfaitement limpide, en soumettant le lysat résultant du broyage en eau distillée à une centrifugation énergique (1 heure et demie à 18.000 tours, soit environ 30.000 G). L'examen microscopique nous a indiqué que nous avions bien éliminé ainsi les granules plaquettaires, ce qui confirme les constatations de FONIO (1950,36). Ces granules sont donc responsables de la turbidité observée sur les lysats insuffisamment centrifugés.

Voici les résultats détaillés de nos dosages comparatifs, effectués sur des lysats non éclaircis, sauf pour l'échantillon T 15 bis :

Echantillon T 1 : lysat obtenu par broyage de 3 g environ de crème plaquettaire en eau distillée - solution étendue à 50 ml (poids sec du lysat : 0,36 g pour 50 ml).

N total..... 65 mg (18 % du lysat sec)
N protéique..... 52 mg (14,4 % du lysat sec)
Protides totaux.....328 mg (91,1 % du lysat sec)

Echantillon T 2 : lysat obtenu par broyage de 1,01 g de crème plaquettaire en solution tamponnée au véronal (pH : 8,6) - volume 22 ml.

N total du lysat..... 42,7 mg
N protéinique du lysat.... 8 mg
N protéinique du résidu... 2,3 mg

Echantillon T 3 : lysat obtenu par broyage de 0,85 g de produit sec en solution tamponnée au véronal (pH : 8,6) - volume 18 ml.

N total du lysat..... 52,9 mg
N protéinique du lysat.... 8,9 mg
N protéinique du résidu... 4 mg

Echantillon T 4 : lysat obtenu par broyage de 0,73 g de produit sec en solution tamponnée aux phosphates (pH : 7,6) - volume 25 ml.

N protéinique du lysat..... 30 mg
N protéinique du résidu..... 23,5 mg

Echantillon T 5 : lysat obtenu par broyage de 0,63 g de produit sec en solution tamponnée aux phosphates (pH : 7,6) - volume 20 ml.

N protéinique du lysat..... 28 mg
N protéinique du résidu..... 25 mg

Echantillon T 7 : lysat obtenu par broyage de 1,18 g de produit sec en solution tamponnée aux phosphates (pH : 7,6) (contact prolongé 24 heures à la glacière) - volume 10,5 ml.

N total du lysat..... 47,25 mg
N protéinique du lysat..... 38,3 mg
N total du résidu..... 52,5 mg
N protéinique du résidu..... 50,8 mg

Echantillon T 10 : lysat obtenu par broyage de 1,12 g de produit sec, en solution tamponnée aux phosphates (pH : 7,6) - volume 15,5 ml.

N total du lysat..... 50 mg
N total du résidu..... 50 mg
N protéinique du lysat..... 43,7 mg
N protéinique du résidu..... 45,7 mg

Echantillon T 11 : lysat obtenu par broyage de 0,50 g de produit sec en solution tamponnée au borate (pH : 8,8) : volume 16,5 ml.

N total du lysat..... 20,7 mg
N total du résidu..... 18,9 mg
N protéinique du lysat..... 17,8 mg
N protéinique du résidu..... 17,2 mg

Echantillon T 14 : lysat obtenu par broyage de 2,62 g de produit sec en solution tamponnée au borate (pH : 8,8) : volume 40 ml.

N total du lysat.....145,6 mg
N total du résidu..... 96,5 mg
N protéinique du lysat.....112 mg
N protéinique du résidu..... 88,74 mg

Echantillon T 15 : lysat obtenu par ultra-sons (800 kilocycles pendant 10 minutes, en atmosphère d'hydrogène) à partir de 1 g de produit sec dans 30 ml de solution tamponnée aux phosphates (pH : 7,6) :

N total du lysat..... 65,75 mg
N total du résidu..... 26,25 mg
N protéinique du lysat..... 58,5 mg
N protéinique du résidu..... 21 mg

Echantillon T 15 bis : 0,65 g du même produit que précédemment, mais lysé en eau distillée, puis en solution de phosphates tamponnée au pH 7,6, et centrifugé énergiquement (90 minutes à 30.000 G) :

N protéinique du lysat (biuret) 28,9 mg
N total du résidu..... 29,4 mg
N protéinique du résidu..... 26,1 mg

Si l'on considère le rendement, c'est-à-dire le passage en solution dans le lysat des protides totaux dosés dans le produit brut, on trouve :

- pour les échantillons lysés en eau distillée puis en tampon phosphate (pH : 7,6) un rendement de 37 %, 42 % et 44 %;

- pour les échantillons lysés en eau distillée puis en tampon borate (pH 8,8), un rendement de 43 % et 45 %;

- enfin pour l'échantillon traité par les ultra-sons, en tampon phosphate (pH 7,6), un rendement de 56 %.

Les valeurs additionnées de l'azote protéinique du lysat et de celui du résidu, dans les expériences les plus complètes, restent inférieures de 8 à 15 % à celles de l'azote protéinique du produit brut.

La disparition des protéines serait imputable aux conditions de l'expérience de lyse. Elle est plus accusée en tampon alcalin, et dépasse 20 % dans le cas du traitement par les ultra-sons.

A titre de comparaison, un échantillon de poudre de leucocytes (poids sec : 0,40 g) fournit, après lyse en solution tamponnée aux phosphates (pH : 7,6), 14,4 mg d'azote protéique dans le lysat pour 28 mg dans le résidu, ce qui confirme la résistance de ces éléments, frais ou desséchés, aux essais de destruction mécanique et de solubilisation. Le résidu présente un aspect caillebotté, qui s'oppose à l'apparence crémeuse du résidu plaquettaire.

c) - Etude électrophorétique :

Cette étude n'avait jamais été entreprise, à notre connaissance. Elle nous a paru indiquée, comme seule susceptible de fournir des renseignements précis sur la nature des protéines plaquettaires. Toutefois, trois réserves sont à formuler d'emblée :

1° - il résulte des analyses précédentes qu'il passe dans le lysat une fraction importante (40 à 45 %), mais non la totalité des protéines : or il n'est pas prouvé que les valeurs obtenues à partir du lysat reflètent exactement la composition des plaquettes entières;

2° - la possibilité d'une dénaturation n'est pas exclue, en dépit des précautions prises.

3° - nos premiers lysats insuffisamment éclaircis, contenaient encore des granules en suspension.

Deux méthodes s'offraient à notre disposition :

- I) la méthode de TISELIUS : précise et quantitative, permettant le calcul des mobilités en valeur absolue, elle exige une solution qui soit à la fois limpide et suffisamment concentrée en protéines : le calcul montre que pour obtenir une solution à 1 % de protéines, sous un volume de 20 ml, il faut partir de 0g,80 de substance sèche (soit près de 6 g. de crème plaquettaire).

- 2) la micro-électrophorèse sur papier (électrorhéophorèse) (57 bis) : plus économique et plus rapide, elle ne fournit que des valeurs comparatives.

I) Electrophorèse selon TISELIUS : cette étude a été effectuée au moyen de l'appareil FOKAL B, dans les laboratoires de l'E.C.R.T.A.

Comme il a été indiqué plus haut, la difficulté principale tenait au défaut de limpidité de nos premières solutions, les images se prêtant mal à l'enregistrement photographique :

La courbe obtenue présente quatre ondulations, mais elle est aplatie sans maximum net. Aucun clocher ne permet de définir une fraction caractéristique. Trop peu d'essais ont été effectués (trois actuellement, dont un seul sur un surnageant parfaitement limpide) pour apprécier la reproductibilité de cette courbe, et en entreprendre valablement la décomposition.

2) Electrorhéophorèse : elle a été pratiquée à l'E.C.R.T.A. puis à l'Institut Pasteur (dans le laboratoire de M. le Professeur MACHEBOEUF), à l'aide de l'appareil de MACHEBOEUF & REBEYROTTE. Les trois examens pratiqués sur des produits analogues aux précédents (le dernier seul étant parfaitement limpide) montrent une masse peu mobile, au voisinage du trait de départ. On observe au lieu de dépôt une tache arrondie, d'aspect granuleux, d'autant plus importante que le lysat était plus opalescent. Nous savons maintenant que ceci correspond aux granules plaquettaires demeurés en suspension. On ne trouve pratiquement rien dans la zone de

l'albumine (note 13).

L'ensemble de ses électrophorégrammes, tant sur papier qu'à l'appareil de TISELIUS, semble indiquer une dénaturation plus importante qu'on ne le soupçonnait initialement. Il intervient probablement - comme il est de règle pour la plupart des extraits tissulaires - une autolyse enzymatique assez rapide pour que l'examen ne révèle plus que des restes difficilement identifiables.

Cependant la richesse des plaquettes en lipides, d'une part, la fragilité connue des lipoprotéines, d'autre part, permet de supposer qu'il rentre dans la composition des plaquettes une part importante de lipoprotéines. L'agitation d'un lysat plaquettaire avec de l'éther enlève relativement peu de substances éthéro-solubles à la température du laboratoire (7,4 mg pour le lysat d'I g de poudre de plaquettes).

En ce qui concerne les enzymes liés au métabolisme des protides, nous n'avons pu apporter de résultats démonstratifs (cf. notre 3° partie): une légère activité protéasique est cependant probable.

°
° °

Les difficultés rencontrées dans l'étude des protéines, ne sont pas nouvelles. Nous avons tenu néanmoins à les exposer avec quelques détails, en raison du caractère inédit de cette recherche appliquée aux plaquettes.

Les résultats obtenus par la méthode de KJELDAHL sont les plus certains, aux erreurs de coefficient près, mais ils ne fournissent qu'une indication globale sur l'importance des protéines plaquettaires.

Des réserves s'imposent au sujet des images électrophorétiques, qui n'ont qu'une valeur d'orientation.

Nous espérons poursuivre et développer cette étude des protéines, qui est seulement ébauchée.

Note 13 : Cependant un examen plus récent - dû à l'amabilité de M. REBEYROTTE et Melle BRUNERIE - a montré, sur un échantillon de lysat plaquettaire concentré (environ 2 % de protéines), une tache significative dans la zone de l'albumine.

4°) - AUTRES CONSTITUANTS CHIMIQUES :

WAGNER (1946,91), ne trouvant pas de glycogène, conclut à l'existence dans les plaquettes de substances réductrices non fermentescibles dérivant principalement de l'acide ribonucléique.

WISLOCKI, RHEINGOLD & DEMPSEY (1949,95), sur la foi de techniques histochimiques, affirment par contre la présence de glycogène dans les plaquettes et le cytoplasme des mégacaryocytes de l'homme (coloration de SCHIFF à l'acide periodique).

FANTL, EBBELS & NELSON (1951,30) admettent que les plaquettes possèdent des groupements SH -, dont le blocage électif par le sublimé leur fait perdre l'aptitude à agir sur la rétraction du caillot.

Notons enfin que l'histamine a été recherchée dans les plaquettes à maintes reprises, par des auteurs principalement soucieux d'établir une relation entre les phénomènes de choc et la disparition des plaquettes. Il résulte de ces travaux (dont CODE a fait récemment une large revue :1952, 20) que les plaquettes du lapin contiennent de l'histamine, tandis qu'il n'en est pratiquement pas décelé dans les plaquettes du cheval et celles de l'homme, et très peu dans celles du chien (note 14).

Cependant PARROT & GABE (1945, 69) ont trouvé dans les plaquettes humaines 0,0019 microgramme d'histamine par million d'éléments : compte tenu de son faible volume, la plaquette serait ainsi l'élément sanguin qui renferme l'histamine à la concentration la plus élevée.

Nous-même, dans un travail récemment publié avec MM. VALETTE & HUIDOBRO (1951,85) avons établi que les plaquettes humaines ne contiennent pas d'histamine, mais qu'elles renferment une histaminase.

Au terme de ce chapitre consacré à la chimie des plaquettes, des objections se présentent, auxquelles nous nous efforcerons de répondre. Elles ne porteront pas sur les méthodes d'analyse elles-mêmes, qui sont classiques, mais sur la valeur représentative du produit étudié.

L'objectif principal de notre travail de chimiste a été d'opérer sur des plaquettes pures. Nous pensons avoir réalisé un notable progrès en éliminant à coup sûr les hématies et en réduisant les leucocytes à l'infime proportion de 1 pour 50.000 ou 100.000 plaquettes. Les constituants plasmatiques sont pratiquement éliminés par trois lavages.

Note 14 : ceci constituerait le seul cas, à notre connaissance, d'une différence nette établie, sur des bases chimiques, entre les plaquettes de divers groupes de Mammifères.

Nous avons considéré avec attention le risque d'extraction, c'est-à-dire de passage en solution de certains constituants des plaquettes au cours des manipulations que comporte toute méthode d'isolement.

Nous pensons avoir réduit ce risque au minimum, en limitant au strict indispensable les centrifugations, en opérant vite, en matériel siliconé et à basse température chaque fois que possible.

La très légère opalescence du liquide surnageant du dernier lavage témoigne de la destruction d'un petit nombre d'éléments.

Inversement la pénétration d'eau, par osmose, et d'électrolytes étrangers dans les plaquettes, est peu probable, puisque l'isotonie du milieu ambiant a toujours été respectée.

Le risque de dénaturation a été envisagé au sujet des protéines. Si nous pouvons épargner aux plaquettes le contact des surfaces mouillables, les variations de pH et de pression osmotique du milieu ambiant, nous ne sommes qu'imparfaitement à l'abri de l'autolyse, même en traitant les plaquettes fraîches dans le minimum de temps et au voisinage de 0° C.

Cependant les travaux récents de TULLIS (1952,87) montrent la possibilité d'une conservation prolongée des plaquettes, non seulement avec leur aspect morphologique, mais avec leurs aptitudes physiologiques propres, à condition de les soustraire aux influences nocives de l'ambiance.

La plus sérieuse objection serait celle-ci : les opérations successives qui aboutissent à fournir des plaquettes pures réalisant une sélection. Les plaquettes récoltées et étudiées ne seraient représentatives que d'une minorité (plaquettes les plus petites, les moins denses, peut-être les moins adhésives), et non de l'ensemble des plaquettes du sang circulant. Par conséquent des éléments plus lourds et plus volumineux, peut-être nucléés, échapperaient à l'analyse.

Cette critique suppose une hétérogénéité de la population plaquettaire, qui pour nous concerne seulement l'âge et la taille des éléments, mais non leur constitution propre (on ne connaît à l'état normal qu'un seul type de plaquettes).

L'hypothèse d'une sélection est d'ailleurs difficilement vérifiable sur le plan expérimental : car comment analyser chimiquement une suspension plaquettaire d'où les leucocytes (riches en acides nucléiques n'auront pas été exclus ? Nous nous trouvons enfermés dans un dilemme : ou opérer sur une récolte brute, avec un doute sur l'origine des substances identifiées (note 15), ou rechercher une purification

Note 15 : Pour rechercher l'influence de la contamination éventuelle, par un petit nombre de leucocytes, d'une population plaquettaire, nous avons fractionné comparativement, par la méthode de SCHNEIDER, un échantillon de plaquettes impures et un échantillon de leucocytes. Ces deux échantillons ont été lavés dans les conditions habituelles et lyophilisés. (expérience T 20).

progressive, au détriment de la quantité.

Dans l'attente d'une méthode qui concilie, sans objection possible, le rendement et la pureté, nous pouvons souligner que nos plaquettes séparées sont douées d'activité respiratoire, et qu'elles exercent également avec netteté une action physiologique sur la rétraction du caillot, propriété qui est classiquement l'apanage des plaquettes intactes.

D'autre part les constatations chimiques, en ce qui concerne l'absence de P nucléique, se trouvent corroborées par les données de l'histochimie, laquelle s'applique à des frottis de sang frais ou de moelle osseuse où les plaquettes se trouvent réparties au hasard et sans effet de sélection.

Nous admettrons donc que les données de l'analyse chimique effectuée sur les plaquettes lavées sont valables au moins dans leurs grandes lignes pour les plaquettes du sang circulant.

---

de la 15

Les prises d'essai étaient respectivement de 0g,207 et de 0g,216 (après correction du taux d'humidité).

Nous avons trouvé les valeurs suivantes pour le phosphore (titré par la méthode de MACHEBOEUF et DELSAL) :

	plaquettes	leucocytes
Fraction acido soluble.....	1.000 γ	800 γ
Fraction lipidique.....	800	600
Fraction nucléique....	95	750
Fraction protéique.....	600	800
P total (pour 100 g).....	1g,34	1g,11

Ainsi les plaquettes contiendraient, sur la foi de ce résultat brut, une quantité significative de P nucléique. Or l'examen cytologique du frottis de contrôle montre qu'il existe environ un leucocyte pour 1.000 plaquettes, soit en poids une contamination de l'ordre de 1 pour 10. Les leucocytes présents peuvent être responsables de 750 : 10 = 75 γ de P nucléique, chiffre très voisin des 95 γ trouvés dans les plaquettes, la différence étant à la limite des erreurs de dosage.

TABLEAU RECAPITULATIF :

Bien que fragmentaires et sous les réserves exprimées ci-dessus, nos données relatives à la composition chimique des plaquettes sanguines de l'homme peuvent se résumer dans le tableau suivant :

- teneur en eau : 86 à 88 %

- Cendres à 300° : 9,6 % - cendres à 400° : 8 %

- N total..... 11 % du poids sec

- pour 100 g de poids sec, on trouve :

  - N total..... 11 g

  - P total..... 1,15 g

  - éléments minéraux décelables au spectrographe d'émission après combustion.....0,39 g

    dont : Na 0,24

    K 0,031

    Ca..... 0,096

    Mg..... 0,02

    Cu..... 0,0012

    Fe..... 0,00065

    Mn..... 0,00016

  - lipides totaux..... 19 g

    dont : graisses neutres..... env. 1,2 g

    phosphatides..... 13,8 g

    (lécithine..... env. 1 g)

    cholestérol libre..... 3,2 g

    cholestérol estérifié..... 0,7 g

  - protides totaux..... 57 g

    dont : probablement une masse importante de lipoprotéines, une faible quantité d'albumine.

III ème PARTIE

METABOLISME DES PLAQUETTES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Nous avons étudié la respiration des plaquettes, et tenté de caractériser quelques systèmes enzymatiques agissant sur les lipides.

CHAPITRE Ier

ACTIVITE RESPIRATOIRE DES PLAQUETTES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

A) - DONNEES ANTERIEURES : Elles sont anciennes et incomplètes.

En 1909, WARBURG (1911,92) déclare que "l'activité respiratoire du sang normal est liée en grande partie à l'intégrité des plaquettes".

ONAKA (1911,64) prépare, au moyen de centrifugations fractionnées de sang de chien et de lapin, des plasmas plus ou moins riches en plaquettes. Il constate que les préparations les plus riches en plaquettes consomment davantage d'O_2 (mesure au manomètre de Haldane-Barcroft, par la méthode de Warburg).

LOEBER (1911, 55) apporte des arguments du même ordre en faveur de la nature cellulaire autonome des plaquettes : le sang humain hirudiné respire davantage que le sang défibriné. Ce résultat n'est pas dû selon lui à la faible diminution du taux des leucocytes, mais à la destruction massive des plaquettes sous l'effet de la défibrination.

A la Réunion plénière de la Société de Biologie, tenue à Paris le 22 mai 1926, ROSKAM signale que "le quotient respiratoire des globulins n'a jamais été établi : rien ne prouve donc que cette consommation d'oxygène s'accompagne d'un dégagement de CO_2 et qu'elle ne dépende pas d'une simple oxydation de substances - phosphorées par exemple - entrant dans la composition des plaquettes". Il réclame ensuite de nouvelles recherches sur le métabolisme de ces éléments.

Au cours de la discussion qui fait suite au rapport de ROSKAM, FIRKET insiste sur l'absence de certitude au sujet du quotient respiratoire des plaquettes, et doute que l'on puisse parvenir à une conclusion formelle. "S'il faut obtenir in-vitro des globulins purs et lavés, centrifugés, repris, appauvris en leurs constituants, de tels éléments déplasmatisés seraient réduits à des cellules mortes".

L'année suivante, (1927) ENDRES & KUBOWITZ (27) publient leurs travaux sur les plaquettes étudiées en milieu plasmatique au manomètre de Warburg, après séparation à partir de sang humain ou de sang de chien citraté.

En atmosphère N_2 + 5 % CO_2 les plaquettes produisent sur glucose N/100 une glycolyse de l'ordre de $Q\,N_2/M$ = 17 à 22.

En atmosphère (Air + 5 % CO_2) le QO_2 oscille entre - 4,9 et - 8,4.

FUJITA (1928 - 38) sépare les plaquettes du sang de rat citraté, par centrifugation à l'aide de l'hématocrite d'ENDRES. Les valeurs obtenues se comparent à celles d'ENDRES et KUBOWITZ sur les plaquettes de chien. La respiration est faible ($Q\,O_2$ = 6,2) mais néanmoins capable d'annihiler la forte glycolyse ($Q\,N_2/M$ = + 25).

En résumé : WARBURG et ses élèves n'ont guère apporté à l'actif de la respiration des plaquettes que des présomptions.

Seuls ENDRES et KUBOWITZ, puis FUJITA ont procédé à des mesures directes. Aucun de ces auteurs n'a établi le quotient respiratoire des plaquettes.

B) - RECHERCHES PERSONNELLES : Nous avons étudié la respiration des plaquettes isolées et lavées au manomètre de WARBURG. Ces recherches se sont déroulées en plusieurs temps.

(1) en juin 1949 : à l'Institut de Biologie (dans le laboratoire de Madame KHOUVINE) nous avons constaté que les plaquettes respiraient activement, mais les techniques encore imparfaites de séparation ne permettaient pas de conclusions formelles.

(2) en novembre 1949 : au Laboratoire de Physiologie générale de la Sorbonne (Melle LE BRETON), plusieurs nouveaux essais fournirent des résultats aberrants pour les raisons suivantes :

- lavage insuffisant des plaquettes, d'où coagulation;
- liquide de dilution non approprié;
- Techniques de siliconage défectueuses.

(3) en juillet 1951 : au laboratoire de l'Institut de Recherches sur le Cancer (Melle LE BRETON), nous avons soumis à l'expérience des suspensions plaquettaires pures, fraîchement préparées à l'E.C.R.T.A., à partir du sang prélevé le matin même. Ces plaquettes, lavées 3 fois en solution isotonique de chlorure de sodium, étaient finalement diluées dans une solution de FLEISCH ou une solution isotonique de chlorure de potassium.

Pour chaque préparation étaient déterminés la teneur en éléments figurés (numérations à l'hématimètre, et frottis de contrôle), et le poids sec. Le transport s'opérait dans un bain-marie à la température de la glace fondante, et les mesures manométriques avaient lieu dans le courant de l'après-midi (soit 7 heures environ après la récolte du sang).

Protocole opératoire :

L'appareil utilisé était un manomètre de WARBURG de conception classique.

(Tubes manométriques garnis de liquide de BRODIE.

- double amplitude : 8 cm.
- vitesse : 78 à 80 oscillations par minute
- cuve équilibrée par thermostat à 37° C).

La suspension plaquettaire à étudier (1 ml) était disposée au fond de la fiole de WARBURG. Le godet central recevait 0,2 ml d'une solution de potasse à 20 % pour l'étude de la seule consommation d'oxygène, 0,2 ml d'eau pour la respiration complète. Eventuellement la soufflure latérale était garnie d'un liquide modificateur.

20 minutes après la mise en place des fioles et manomètres, les prises d'air étaient fermées, et les lectures effectuées de quart d'heure en quart d'heure jusqu'à 60 minutes (les valeurs notées pour chaque période de 15 minutes sont d'ailleurs sensiblement comparables au cours d'une même expérience).

En fin d'opération, le pH était mesuré au BECKMAN.

Chaque série comportait un témoin thermo-barométrique.

Résultats : des six expériences pratiquées, nous ne retiendrons que les cinq dernières, pour la sécurité des résultats.

	O_2 consommé (par heure et par ml)	CO_2 dégagé (par heure et par ml)	CO_2 / O_2
Exp.n°2 : 15 milliards de plaquettes pour I ml.....	118 mm3	116 mm3	0,99
Exp.n°3 : 7,8 " " "	45,2	46,5	1,03
Exp.n°4 :18,5 " " "	118	117	0,99
Exp.n°5 :18,7 " " "	182,5	167,5	0,92
Exp.n°6 :15 " " "	136	137	1,01

Ceci correspond dans les conditions expérimentales à une consommation d'oxygène moyenne de 8 mm3 (valeurs extrêmes : 6 et 10 mm3) par milliard de plaquettes et par heure - soit 2,9 mm3 par milligramme de poids sec (note 16).

Dans les mêmes conditions, le dégagement de CO_2 est de 7,8 mm3 par milliard de plaquettes et par heure (valeurs extrêmes : 6,3 et 9,1 mm3). - et le quotient respiratoire CO_2 / O_2 de 0,98 $\pm$ 0,04 (valeurs notées : 0,99 - 1,03 - 0,99 - 1,01).

La pureté de nos préparations de plaquettes ressort du protocole suivant :

	G.R.	G.B.en numération directe	G.B.sur frottis colorés :
exp.2 : 14.960.000 par mm3	0	304	moins de 1 G.B. pour 25.000 plaquettes
exp.3 : 7.880.000 "	0	40	1/100.000
exp.4 : 18.500.000 "	0	122	1/50.000
exp.5 : 18.680.000 "	0	144	1/100.000
exp.6 : 15.120.000 "	0	280	.....

Nous devons noter qu'il n'y a pas de parallélisme rigoureux entre la richesse en plaquettes de nos préparations et la quantité d'oxygène consommée : ceci peut s'expliquer soit par un début d'altération des plaquettes en expérience, soit par une erreur relative dans les données de la numération (qui n'avait été effectuée qu'une seule fois pour chaque préparation). Aussi la consommation d'oxygène et le dégagement de CO_2, par milliard de plaquettes et par heure, ne sont connus qu'approximativement. Mais cette réserve sur la valeur absolue des échanges gazeux n'enlève rien à la précision du quotient respiratoire, qui paraît

Note 16 : Ce dernier chiffre est inférieur à ceux d'ENDRES et KUBOWITZ: 8,4 pour les plaquettes du sang humain, 4,9 à 5,4 pour celles du chien - et de FUJITA : 6,2 pour les plaquettes du rat. Mais la divergence n'est pas considérable, si l'on observe que les auteurs cités opéraient sur des suspensions plaquettaires de concentration dix fois moindre, et en plasma citraté. La pureté de leurs préparations n'est pas mentionnée.

indépendant du chiffre des plaquettes dans nos conditions d'expérience.

Au cours de ce travail, nous avons ajouté aux plaquettes des substances susceptibles de modifier dans un sens déterminé la respiration cellulaire :

- adrénaline seule
- cytochrome + adénosine triphosphorique
- " " " " + adrénaline
- " " " " + acide octanoïque
- " " " " + " " + adrénaline
- acide octanoïque + Glucose
- " " + " + adrénaline.

L'introduction de ces nouveaux éléments (dont l'étude nécessitait de nombreux témoins et surchargeait considérablement le protocole opératoire) n'a pas entraîné de modifications significatives.

CHAPITRE II

ACTIVITE ENZYMATIQUE DES PLAQUETTES

-:-

A) - DONNEES ANTERIEURES :

Les plaquettes ont été de bonne heure l'objet de recherches tendant à démontrer la présence de ferments, comme tests de leur vitalité.

En l'absence d'une étude d'ensemble basée sur des techniques modernes, nous citerons rapidement, dans l'ordre chronologique, les principaux travaux :

C'est ainsi que, d'après ROSKAM (1926,74), les plaquettes contiennent :

-très rarement de l'amylase (BARREAU);
-constamment une catalase (SCHNEIDER, BARREAU);
- et une diastase protéolytique absente dans le plasma, dédoublant plus énergiquement encore que celle des globules rouges la glycyl-l-tyrosine (ABDERHALDEN & DEETJEN, ABDERHALDEN & MANWARING,1908).

Mais ROSKAM lui-même (1924) n'a pas trouvé de ferments protéolytiques ni lipolytiques dans les plaquettes de l'homme et du chien.

GRAHAM (1916) et KATZANURA (1925-1923) affirment la présence d'oxydases.

ASCHOFF (1925) reconnaît une seule oxydase, labile, dans les mégacaryocytes et les plaquettes. RICHTER (1921) a trouvé des peroxydases, ROSKIN & GRUNBAUM (1925) des DOPA-Oxydases. SMITH et ses collaborateurs (1938) nient la présence d'oxydases et de peroxydases dans les mégacaryocytes et les plaquettes de l'homme (techniques histochimiques).

IGLAUER & WEBER (1931 - 50) confirment l'existence d'une catalase, active au pH 6,5 (technique d'IGLAUER) dans les plaquettes du sang humain.

Selon IYENGAR (1942,51) les plaquettes du cheval contiennent une trypsine-kinase.

CHEVILLARD (1945, 17 et 1946, 19) a mis en évidence dans les plaquettes du lapin une phospho-mono-estérase unique, attaquant les α - et β -glycérophosphates de sodium, avec un maximum d'activité entre les pH 5 et 5,5, inhibée par l'ion magnésium;
et une pyrophosphatase dont le pH optimum se situe entre 5,8 et 6, nettement activée par l'ion magnésium.

NIKOLAEVA (1946, 61), étudiant l'activité enzymatique des extraits de plaquettes de l'homme et du chien, décrit une enzyme protéolytique du type tryptase, agissant sur l'ovalbumine, et une amylase, caractérisée par la méthode de METT, mais ne trouve pas de lipase (recherche sur le lait tournesolé).

FISHMAN & al. (1947,34), choisissant comme substrat le phénolphtaléine-glucuronide, ne trouve pas de β -glucuronidase dans les plaquettes.

Enfin, nous-mêmes, avec MM. VALETTE et HUIDOBRO (1951,85) avons mis en évidence une activité histaminasique dans les plaquettes humaines.

ZAJICEK et DATTA, en 1952 (96), ont caractérisé une choline-estérase dans les plaquettes du rat.

B) - RECHERCHES PERSONNELLES :

I - Etude de quelques systèmes enzymatiques agissant sur les lipides;
2 - Essai de mise en évidence d'une activité protéasique des plaquettes.

I - ETUDE DE QUELQUES SYSTEMES ENZYMATIQUES AGISSANT SUR LES LIPIDES.

A) - La désaturase a été recherchée en utilisant la technique mise au point

par LANG, ARNAU puis J. CHAMPOUGNY et E. LE BRETON (15b, 51b) : elle consiste à suivre la déshydrogénation de l'acide palmitique pris comme substrat (sous forme de palmitate de sodium N/100) par la décoloration du bleu de méthylène dans un tube de THUNBERG. Le bleu de méthylene, en fixant l'H2, passe à l'état de leuco-bleu incolore. L'adénosine (100 γ par ml) et la vitamine PP (100 γ par ml) sont ajoutées au titre de coenzymes. Le pH est de 8 (tampon aux phosphates). Cette recherche pratiquée sur un échantillon de plaquettes fraîches (pureté de l'échantillon : 1 leucocyte pour 25.000 plaquettes) a été négative.

B) - Les enzymes hydrolysant les phosphatides, à savoir les <u>lécithases</u>, ont été recherchées par incubation directe et par incubation dans du plasma humain normal. Voici les résultats :

<u>Premiere expérience</u> (échantillon L 2) : 1° : incubation directe : dosage des phosphatides en début d'expérience : 9,7 mg d'acides gras phosphatidiques par g de plaquettes fraîches;

-après 3 jours d'incubation à 37° C :..... 7,2 mg d'acides gras phosphatidiques par g de plaquettes fraîches.

La différence apparaît peu significative. Après contrôle, l'échantillon s'est montré relativement impur (environ 1 leucocyte pour 1.500 plaquettes)

2° : incubation en plasma (plasma humain citraté, en présence de faibles quantités de pénicilline et de streptomycine) :

1°) <u>Plasma frais</u> : dosage des phosphatides en début d'expérience: 19,1 mg d'acides gras phosphatidiques;
- dosage des phosphatides après 3 jours à 37° C : 6,6 mg d'acides gras phosphatidiques;
- soit une différence de 12,5 mg indiquant une lyse de 65 %.

2°) <u>Plasma inactivé</u> + plaquettes (contrôle cytologique : 1 leucocyte pour 8.000 plaquettes) : en début d'expérience : 31,6 mg d'a.g.phosphatidiques;
après 3 jours à 37° C : 26,3 mg d'a.g.phosphatidiques;
soit une différence de 5,3 mg, indiquant une lyse de 16,5 %.

Plasma inactivé, incubé 3 jours à + 37° C : 18,3 mg d'a.g.phosphatidiques.

<u>Deuxième expérience</u> (échantillon L 3) : plaquettes de 24 heures :

1°) <u>Plasma chauffé</u> : 8,6 mg d'a.g. phosphatidiques;
" " après 3 jours à + 37° C : 9,8 mg
(cette première détermination avait pour but de contrôler l'inactivation de la lécithase présente dans le plasma).

2°) Plasma inactivé, additionné de 0,5 g de suspension plaquettaire concentrée : 19 mg d'a.g.phosphatidiques;

Plasma inactivé, additionné de 0,5 g de suspension plaquettaire concentrée apres 40 heures d'incubation à + 37° C (note 17) : dosage sur 2 échantillons de : 16,3 mg et 16,5 mg.,

ce qui indique une disparition de 13 % des a.g.phosphatidiques.

3°) Plasma inactivé, additionné de 1,5 g d'une suspension leucocytaire diluée : 20,5 mg. d'a.g. phosphatidiques.

Plasma inactivé, additionné de 1,5 g d'une suspension leucocytaire diluée après incubation de 40 heures à + 37° C : 21,3 mg.

4°) Plasma inactivé, additionné de 1,5 g d'une suspension leucocytaire concentrée : 33,3 mg d' a.g phosphatidiques.

Plasma inactivé, additionné de 1,5 g d'une suspension leucocytaire concentrée apres incubation de 40 heures à + 37° C : 34,5 mg.

Ces deux dernières recherches avaient pour but de déceler l'activité lécithasique éventuelle des leucocytes : elle s'est montrée négative dans les conditions de l'expérience.

Par contre, les plaquettes étudiées présentent constamment une activité lécithasique faible, la différence de 12 à 15 % entre les chiffres de départ et ceux de la fin de l'incubation dépassant notablement les erreurs de dosage.

Deux réserves s'imposent toutefois :

1°) la détermination portait sur les acides gras phosphatidiques totaux, et non sur les seules lécithines : la disparition d'a.g. phosphatidiques observée pourrait tenir à une destruction de la céphaline, qui n'a pas été dosée dans nos expériences.

2°) ces recherches ont été faites sans considération d'un système activateur.

Note 17 : Cette incubation, réalisée en fiole de WARBURG avec agitation continue et en présence de faibles quantités d'antibiotiques, n'a pu être prolongée jusqu'à 72 heures pour des raisons matérielles.

II - ESSAI DE MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE PROTEASIQUE DES PLAQUETTES :

Deux essais ont été entrepris sur des plaquettes fraîches, recueillies stérilement et conservées en deux fractions aliquotes, l'une à + 37° C (incubation de 3 jours) et l'autre à la glacière à + 4° C. Les dosages d'azote protéinique effectués comparativement par la méthode de KJELDAHL sur l'échantillon maintenu à + 37° C et sur l'échantillon témoin, ont montré une disparition de 21 % des protéines dans la première expérience, de 6 % dans la seconde.

Ces résultats, qui semblent en faveur d'une légère activité protéasique globale des plaquettes, ne sont mentionnés qu'à titre indicatif, en attendant des recherches plus précises.

•
° °

Nous devons signaler au sujet du métabolisme des plaquettes quelques éléments nouveaux dont nous n'avons pu prendre connaissance qu'après la rédaction de ce travail:

1) ALEXANDER écrit dans le livre édité par TULLIS (1953, 82bis), p. 78 : "On sait peu de choses de la composition chimique des plaquettes, et l'on ignore si elles sont "viables" dans le sens d'une activité métabolique. Nous avons récemment trouvé qu'elles sont dépourvues de lipase, de phosphatase alcaline, de sulfatase, de cholinestérase, de carboxypeptidase et de chymotrypsine. Mais elles contiennent des quantités substantielles d'estérase, de phosphatase acide et de glucuronidase. Le rôle de ces enzymes dans la fonction des plaquettes est toutefois très obscur".

2) ZAMECNIK & BAKER (cités par TULLIS, id. p.148), n'ont pu démontrer l'incorporation d'une D.L. leucine marquée au C_{14} dans les protéines plaquettaires. Ceci est en nette opposition avec l'incorporation rapide de cet amino-acide par les leucocytes.

3) TULLIS lui-même (l.c.) note qu'aucune preuve convaincante de l'activité métabolique des plaquettes fraîchement séparées ou conservées n'a été apportée. La simple observation de l'utilisation du glucose et de l'accumulation d'acide lactique ne montre pas de changements significatifs.

IVème PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSIONS :

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

La plaquette sanguine de l'homme est-elle une cellule vivante ?

Parvenu à ce stade de notre travail, nous pensons être suffisamment documentés pour émettre une opinion sur la valeur cellulaire des plaquettes sanguines de l'homme.

Apres un bref rappel des positions prises par les précédents auteurs, nous résumerons les arguments nouveaux qui constituent le fruit de nos recherches, et nous tenterons une synthèse qui sera notre conclusion.

I - RAPPEL DES POSITIONS PRISES PAR LES PRECEDENTS AUTEURS.

Le probleme de la nature cellulaire des plaquettes a été longtemps confondu avec celui de leur origine. Nous n'aborderons pas ici la discussion sur la genese des plaquettes, ce débat ayant été longuement exposé notamment par TOCANTINS (1938-81) et par SALTZMAN (1949-75bis) :

"Toutes les cellules imaginables ont été successivement désignées comme les cellules mères des plaquettes". Nous considérerons, avec la majorité des auteurs, l'origine mégacaryocytaire comme suffisamment démontrée.

a) ACHARD et AYNAUD (1908) se sont faits les ardents défenseurs de la "vitalité" des plaquettes sanguines, ROSKAM (1927,74) a repris et développé leurs arguments, qui apparaissent aujourd'hui fort discutables.

FIRKET, en 1926, les mettait en doute, en soulignant que le quotient respiratoire des plaquettes n'avait pas été établi.

JOLLY (1923,52) admet l'hypothèse de "débris cellulaires" comme la plus vraisemblable. Il en est de même de HITTMAIR (1938,46b) qui leur dénie la valeur de cellules vivantes autonomes, ce qui n'enlève rien à leur importance physiologique.

b) Depuis une vingtaine d'années, l'intérêt s'est porté plus spécialement sur la démonstration de substances nucléaires dans les plaquettes.

Rappelons que pour ROHR et KOLLER (1936,72), pour VOIT et KETPA (1934,89), puis VOIT (1948,90), de même que pour SPADOLINI (1936), les plaquettes possedent un noyau. Ainsi que nous l'avons exposé dans le chapitre "Histochimie", la plupart des auteurs expriment un avis contraire. GUTTMANN (1947,41), CAJANO et POLOSA (1950,14) émettent une opinion éclectique, basée sur la positivité à la réaction de FEULGEN de plaquettes très jeunes, normales ou pathologiques.

Aucun auteur n'a caractérisé, par analyse chimique, l'acide désoxyribonucléique.

c) En dehors du noyau lui-même, la présence de ribo-nucléo-protéines dans le hyaloplasme fournirait un argument intéressant sur la nature cellulaire des plaquettes. Or nous avons vu que GUTTMANN (1947,41), VAN OYE (1948,88), RHEINGOLD et WISLOCKI (1948,71) n'ont pas trouvé d'acide ribonucléique par les techniques histochimiques.

WAGNER (1946,91) est le seul auteur, à notre connaissance, qui ait recherché et décelé par voie chimique, l'acide pentose-nucléique.

d) Enfin, en ce qui concerne la morphologie et la structure des plaquettes, des techniques nouvelles, l'étude au microscope électronique et la microcinématographie en contraste de phase ont apporté d'intéressantes précisions.

Pour BESSIS, (1952,5) les plaquettes sont mobiles et possèdent une vacuole contractile.

Pour lui comme pour BERNHARD et BRAUNSTEINER (cf.thèse de FEBVRE,1951,31) le microscope électronique révèle une ultra-structure finement granuleuse de l'hyaloplasme, BRAUNSTEINER évoque à leur sujet l'existence de "microsomes" au sens de CLAUDE. Or ces microsomes sont par hypothèse composés de ribo-nucléo-protéines et jouent un rôle important dans le métabolisme cellulaire.

II - APPORTS PERSONNELS :

En dehors de la méthode de séparation et du calcul de certaines données physiques, qui ne constituaient qu'un travail préparatoire, nous apportons les indications suivantes :

1°) l'autonomie des plaquettes par rapport aux leucocytes, déjà solidement établie par les précédents auteurs, est corroborée par :

- la présence dans les leucocytes de l'histamine et du zinc, que nous n'avons pas décelés dans les plaquettes;

- la différence d'aspect du lysat en eau distillée (aspect caillebotté pour les leucocytes, crémeux pour les plaquettes);

- la différence dans le devenir des éléments transfusés : les leucocytes humains marqués au ^{32}P et injectés au lapin par voie veineuse, sont arrêtés par le poumon, tandis que les plaquettes marquées se localisent électivement dans la rate (JULLIARD, MAUPIN et coll. 1952,53).

2°) La réaction de FEULGEN et la réaction nucléale de TURCHINI, appliquées aux plaquettes, sont négatives, ainsi que la réaction de BRACHET à la ribonucléase. Les plaquettes humaines ne présentent donc ni désoxyribo-, ni ribonucléine histochimiquement décelables.

La chimie analytique confirme entièrement les données de l'histochimie : la méthode de SCHNEIDER ne nous a montré que des traces insignifiantes de phosphore nucléique.

3°) Par la spectrographie d'émission, nous avons caractérisé et dosé certains métaux parmi lesquels le sodium (0,24 % du poids sec), le potassium (0,031 %), le calcium (0,096 %), le magnésium (0,02 %) et des traces de cuivre, de fer et de manganèse.

4°) Les plaquettes contiennent environ 19 % de leur poids sec en lipides, constitués en majorité par des phosphatides (13,8 %), du cholestérol (3,9 % dont 3,2 % à l'état libre, 0,7 % à l'état estérifié), et très peu de graisses neutres (1,2 %). La lécithine représente environ 1 % et le phosphore total, dosé par la méthode de MACHEBOEUF et DELSAL, 1,15 % du poids sec.

5°) Elles contiennent environ 57 % de protéines, dont la nature n'a pu encore être caractérisée avec précision, malgré plusieurs essais d'analyse électrophorétique. Il semble que les plaquettes soient riches en lipoprotéines.

6°) Nous avons étudié la respiration des plaquettes au manomètre de WARBURG : dans nos conditions d'expérience, les plaquettes sanguines de l'homme consomment en moyenne 8 mm3 d'O_2 et dégagent 7,8 mm3 de CO_2 par milliard et par heure, soit 2,9mm3 d'O_2 consommé et 2,8 mm3 de CO_2 produit par milligramme de poids sec. Leur quotient respiratoire est donc voisin de 0,98.

7°) Les plaquettes possèdent une activité lécithasique faible, la recherche de la désaturase a été négative.

III - CONCLUSIONS.

A la lumière de ces données, anciennes et nouvelles, nous pouvons reprendre les arguments énumérés en fin de notre Avant-Propos.

I°) Les plaquettes sont constituées d'une partie claire, l'hyalomère ou hyaloplasme, faiblement colorable, et d'éléments granuleux qui présentent une affinité azurophile.

Aucune investigation dans le domaine de la structure n'a permis d'établir la présence d'un noyau. Le microscope électronique confirme l'existence de granules grossiers, qui constituent le chromomère, et dont la nature exacte demeure à l'étude. La destruction des plaquettes suivie d'une centrifugation énergique, permet d'isoler ces granules, ce qui laisse entrevoir une possibilité d'identification.

2°) L'hyaloplasme possède une mobilité particulière, dont la constatation exige certaines conditions d'observation, telles que le réalise la microcinématographie en contraste de phase. Les plaquettes possèdent également une vacuole contractile. Ces arguments, qui plaident en faveur de la "Vie" des plaquettes ne prouve pas qu'il s'agisse de cellules entières, puisque ces phénomènes peuvent s'observer sur des cellules énucléées.

3°) L'existence d'une respiration autonome, avec un quotient respiratoire voisin de l'unité, est une constatation importante, qui élimine définitivement toute hypothèse d'un "précipité plasmatique" ou d'un quelconque artefact.

Mais là encore il ne s'agit pas d'un phénomène lié obligatoirement à la présence d'un noyau.

Nous manquons de données sur le métabolisme des plaquettes. Notons toutefois que le succès du marquage par le radio-phosphore témoigne d'une possibilité d'incorporation, d'une activité d'échange avec le milieu ambiant.

4-5°) Aucun accroissement n'a pu être constaté dans le cas des plaquettes, non plus qu'aucune mitose.

6°) Reste la question de la composition chimique des plaquettes.

Aucune des données de l'analyse chimique ne s'oppose à ce qu'elles soient considérées comme de la matière vivante. Leur teneur en lipides et en protéines, leur activité enzymatique (encore qu'insuffisamment étudiée) témoignent au contraire dans ce sens.

Mais ni la chimie analytique, ni l'histochimie ne permettent d'établir la présence (en quantités significatives) d'acides nucléiques : ceci veut dire que les plaquettes, non seulement ne possèdent pas de noyau, ou d'organite équivalent (rôle attribué par certains auteurs aux granules plaquettaires), mais ne renferment pas non plus de ribonucléoprotéines. Elles sont donc incapables d'opérer des synthèses telles que celles des protéines.

Il est difficile dans ces conditions de reconnaître aux très fines granulation observées au microscope électronique (et distinctes des granules grossiers que révele le microscope optique) la valeur de microsomes.

°
° °

Quelle est donc la signification des plaquettes ?

Ce ne sont pas de vraies cellules, puisqu'elles n'ont pas de noyau et ne se reproduisent pas. Mais elles présentent les caractères de la matière vivante (mobilité, possibilité d'échanges avec le milieu ambiant, activité enzymatique variée, respiration). Et leur parenté chimique et histochimique avec le cytoplasme du mégacaryocyte a été amplement démontrée.

Nous arrivons finalement à les considérer comme des fragments cytoplasmiques détachés de la périphérie du mégacaryocyte.

L'échec des tentatives de démonstration de l'acide ribonucléique n'est pas une objection à cette manière de voir, puisque la ribonucléoprotéine n'est pas un constituant obligatoire du cytoplasme. Quand elle existe, elle se localise le plus souvent en bordure du noyau (et plus précisément dans les microsomes).

Dans le cas particulier du mégacaryocyte, RHEINGOLD et WISLOCKI indiquent la présence d'acide ribonucléique : il est probable qu'elle ne se manifeste pas dans les portions périphériques de la cellule qui donnent naissance aux plaquettes. Le mécanisme intime qui préside à la fragmentation du mégacaryocyte, puis au passage des plaquettes dans la circulation, est d'ailleurs parfaitement inconnu.

Dépourvues de noyau, dénuées d'activité synthétique profonde, les plaquettes ainsi libérées ne peuvent que se survivre, pour un temps limité qui est de l'ordre de 4 à 5 jours. Ceci ne contredit pas, comme le soulignait déjà HITTMAIR (1938), leur rôle physiologique, qui est lié à des propriétés physico-chimiques et enzymatiques parfaitement compatibles avec l'absence de noyau.

Cette explication est celle qui cadre le mieux avec les faits. Elle place néanmoins les plaquettes sanguines dans un cadre très particulier, et leur confère un type biologique qui n'est pas celui de la cellule, mais d'un fragment cellulaire doué d'une autonomie importante.

Nous rejoignons ici l'opinion récemment exprimée par UNDRITZ (1950, 84bis) pour qui la plaquette constitue le stade fonctionnel et circulant de la lignée mégacaryocytaire, uniquement composée de cytoplasme du mégacaryocyte. Cet auteur attire en outre l'attention sur un fait particulier qui est la polyploïdie obligatoire du Mégacaryocyte, s'opposant à la diploïdie des autres éléments figurés du sang (note 18).

Les corps puriques dosés dans les plaquettes seraient le reflet de substances nucléaires désintégrées, expulsées par leur cellule mère au cours du vieillissement.

o
o o

Les plaquettes sanguines de l'homme (et par extension celles des Mammiferes) apparaissent ainsi comme des structures spécialisées, mais non nucléées, aptes à jouer le même rôle dans l'hémostase, la coagulation et la rétraction du caillot, que les thrombocytes nucléés des lignées inférieures.

Note 18 : Dans un travail récent, dont nous n'avons eu connaissance qu'en toute derniere heure, TULLIS (1953,82bis) admet également que la plaquette est une cellule incomplète. "Elle manque à la fois de noyau et de structure fine. L'hypothèse longtemps acceptée qui en fait un fragment cytoplasmique du mégacaryocyte est encore satisfaisante à la lueur des notions actuelles".

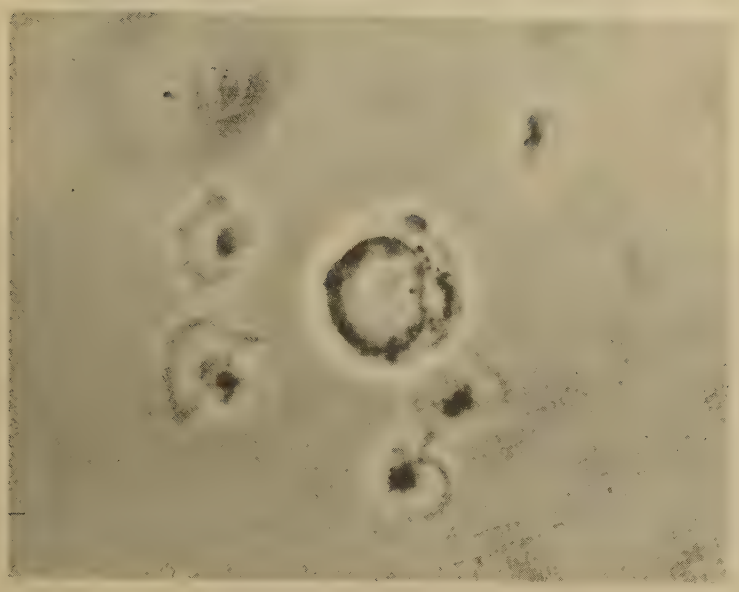

Fig. 1 : Plaquettes étalées sur verre, examinées au contraste de phase.

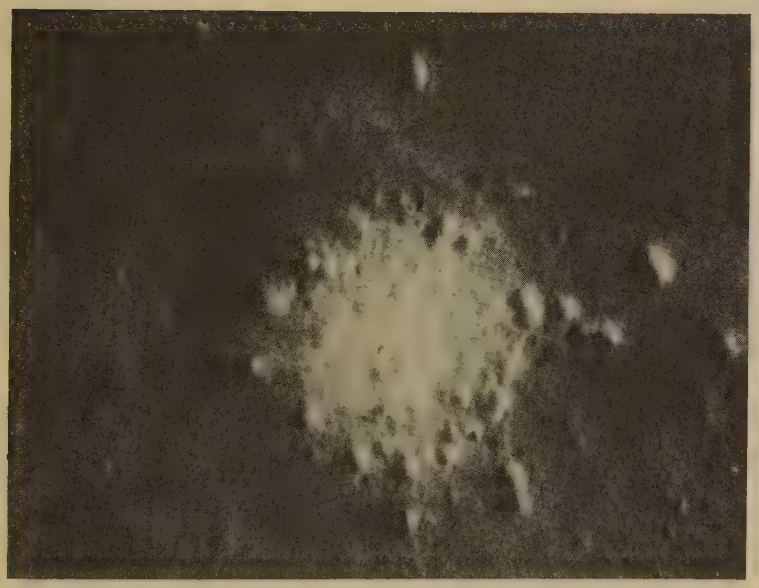

Fig. 2 : Granulations d'une plaquette détruite par éclatement (microscope électronique, ombrage à l'or). Clichés dus à l'amabilité de M. le Dr BESSIS(du Centre Régional de Transfusion Sanguine).

Fig. 3 : Plaquette étalée, examinée au microscope électronique (sang héparine, étalement de 5 minutes - grossissement original x 4.500, agrandissement final : x 10.800). Cliché dû à l'amabilité de M. BERNHARD, de l'Institut de Recherches sur le Cancer).

Fig.4 : Ultra-structure de l'hyaloplasme d'une plaquette normale,étalée sur verre (Microscope électronique,- fixation par l'alcool éthylique,- ombrage à l'or).

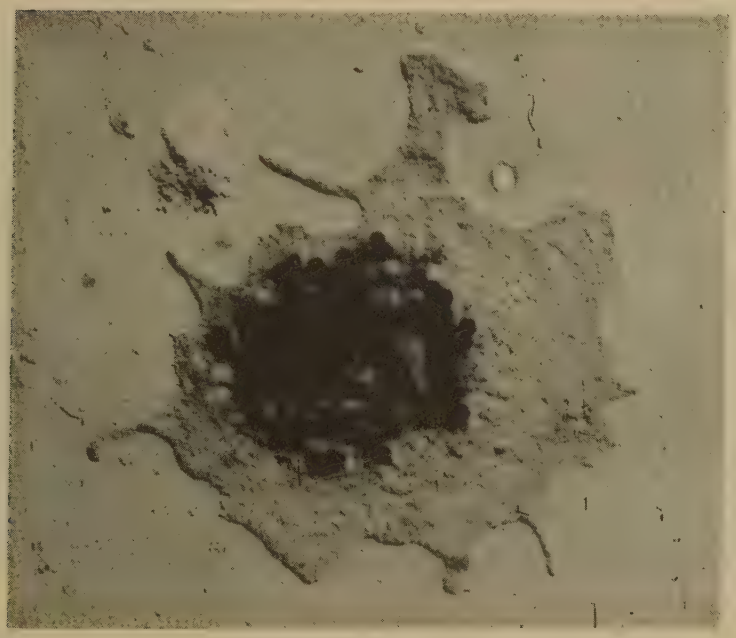

Fig. 5 : Plaquette étalée, examinée au microscope électronique (fixation par l'acide osmique à 0,2%- ombrage à l'or).Clichés dus à l'amabilité de M. le Dr. BESSIS.

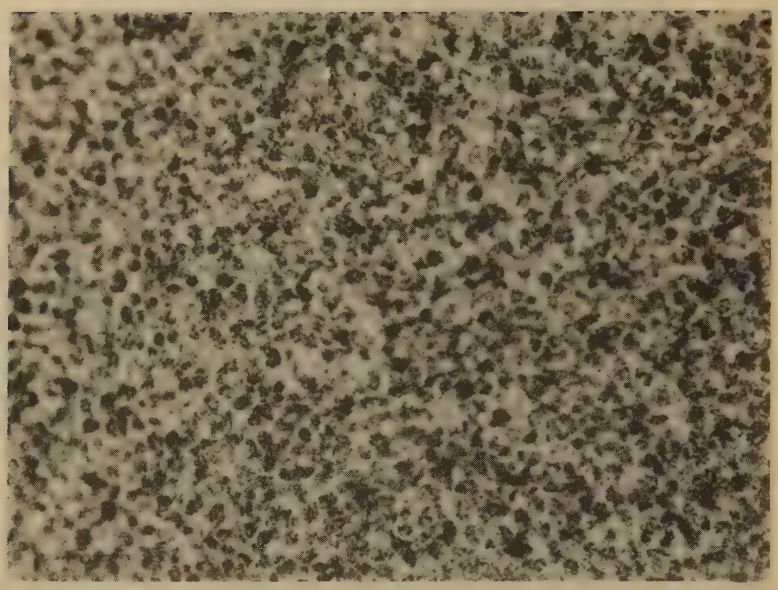

Fig. 6 : Préparation plaquettaire pure,colorée au MAY-GRUNWALD-GIEMSA. Cliché personnel (Laboratoire Central de l'Armée).

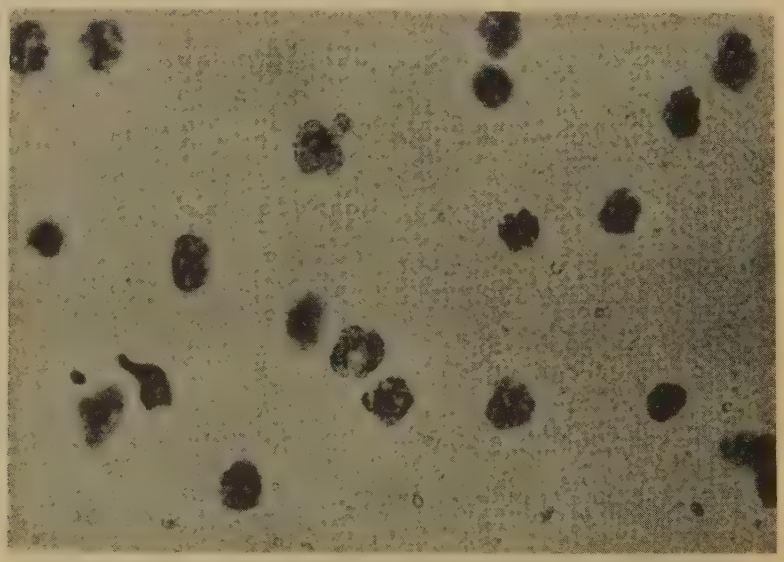

Fig. 7 : Résultat d'une coloration de FEULGEN sur une préparation leucocyto-plaquettaire. Cliché personnel (id.).

B I B L I O G R A P H I E

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Les références principales, en ce qui concerne la morphologie et la physiologie des plaquettes sanguines, se trouvent dans les ouvrages de HAYEM, 1923 (44)
JOLLY, 1923 (52)
ROSKAM, 1927 (74)
HITTMAIR, 1932 (46),

et dans les articles plus récents de

TOCANTINS, 1938 (81)
BURSTEIN & BESSIS, 1948 (12)
SALTZMAN, 1948 (75bis)
FEBVRE, thèse 1951 (31)
BESSIS & BRICKA, 1952 (5)
STEFANINI, 1953 (78 bis)

Les auteurs sont classés par ordre alphabétique :

1 - ALEXANDER B. : Ac-Globuline et S.P.C.A. : deux facteurs plasmatiques de la conversion de la prothrombine. Rev.Hémat., 1952, 7 168-227

2 - ALEXANDER B. : Some biochemical, physiological and pathological aspects of the coagulation mechanism : in TULLIS 1953, pp. 75-92

3 - BEAMS H.W. & KING R.L. : Feulgen's nucleal reaction and blood platelets. Anat. Record, 1933, 55 (4° suppl.), p.46

4 - BESSIS M. : Cytologie sanguine normale et pathologique. Masson éd., Paris 1948

5 - BESSIS M. & BRICKA M. : Aspect dynamique des cellules du sang. Son étude par la microcinématographie en contraste de phase. Rev.Hémat, 1952, 3, 407-435

6 - BLOOM M.L. & WISLOCKI G.B. : The localization of lipids in human blood and bone marrow cells. Blood 1950, 5, 79-88

7 - BRACHET J. : La détection histochimique des acides pentose-nucléiques. C.R. Soc.Biol., 1940, 133, 88-90

8 - BRACHET J. : La spécificité de la réaction de Feulgen pour la détection de l'acide thymonucléique. Experientia, 1946, 2, 142-143

9 - BRACHET J. : Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon. Masson éd., Paris 1952

10 - BROWN A.H. : Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose, Arch.Bioch.,1946,11,269-278

11 - BUDTZ-OLSEN O.E. : Clot Retraction, BLACKWELL éd.,Oxford,1951

12 - BURSTEIN M. & BESSIS M. : Etudes sur la physiologie des thrombocytes, Rev. Hémat., 1948, 3, 69-91

13 - BUTLER A.M. & CUSHMAN M. : Distribution of ascorbic acid in blood and its nutritions significance, J. Clin. Inv.,1940, 19, 459-467

14 - CAJANO A. & POLOSA P. : Contributo allo studio della morfologia dei megacariociti e delle piastrine con la reazione di Feulgen. Haematologica, 1950, 34, 1113-1121

15 - CAMINADE R. : Sur quelques modifications apportées au dosage de la cholestérine par la méthode de WINDAUS. Bull. Soc. Chim.Biol., 1922,4, 601-613

15 bis - CHAMPOUGNY J. et LE BRETON E. : Recherches sur la déshydrogénase des acides gras supérieurs: obtention quantitative de l'enzyme à partir du foie.C.R. Soc.Biol. 1945,139, 919-921

16 - CHARGAFF E., BANCROFT F.C. & STANLEY-BROWN M. : The chemical constituents of blood platelets and their role in blood clotting, J.Biol.Chem.,1936,116, 237-251

17 - CHEVILLARD L. : Sur les phospho-mono-estérases... C.R. Soc. Biol., 1945, 139, 249-250

18 - CHEVILLARD L. & HAYON F. : Sur un procédé de séparation des éléments du sang (globules rouges, plaquettes, leucocytes),C.R.Soc.Biol.,1945,139, 286-288

19 - CHEVILLARD L. : Sur les pyrophosphatases... C.R. Soc. Biol., 1946, 140, 955-956

20 - CODE C.F. : Histamine in blood. Physiol. Rev.,1952, 32, 47-65

21 - COPLEY A.L. & HOULIHAN R.B. : Studies on platelets : the isolation of platelets from human and dog blood. Blood (special issue,I), 1947, 2, 170-181

22 - CORRADETTI A. : La reazione di Feulgen sulle piastrine. Boll,Soc. Ital.Biol.Sper. 1933, 8, 603-605

23 - CRISTOL P. : Nouvelles études sur la désalbumination du sang en vue du dosage de l'azote total non protéique et de la détermination de l'indice de polypeptidémie. Bull.Soc.Chim.Biol.,1929,11,93

24 - DILLARD G.H.L., BRECHER G. & CRONKITE E.P. : Separation, concentration and transfusion of platelets.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 78, 796-799

25 - EMERSON C.L.jr : Falling film centrifuge, in "Proceedings of the Second Conference on the Separation of the formed elements and proteins of the blood", BOSTON 11-7-1950

26 - ENDRES G. : Ein Verfahren zum Anreichern von weissen Blutkörperchen und Blutplättchen aus kleinen Blutmengen.
Klin. Woch., 1927, 6, 1407

27 - ENDRES G. & KUBOWITZ F. : Stoffwechsel der Blutplättchen,
Bioch. Z., 1927, 191, 395-397

28 - ENDRES G. & HERGET L. : Mineral Zusammensetzung der Blutplättchen und weissen Blutkörperchen. Z. für Biol., 1929, 88, 451-464

29 - ERICKSON B.N., WILLIAMS H.H., AVRIN I. & LEE P.: The lipid distribution of human platelets in health and disease.
J. Clin. Inv., 1939, 18, 81-85

30 - FANTL P., EBBELS L. & NELSON J.F. : Presence of thiol groups in platelets and their significance in the contraction of fibrin gels. Brit. J. Exp. Path., 1951, 32, 538-546

31 - FEBVRE H.L. : "Eléments figurés du sang au microscope électronique : technique et principaux résultats".
Thèse Médecine, Paris, 1951.

32 - FEISSLY R. & LUDIN H. : Microscopie par contraste de phase : applications à l'hématologie.
Rev. Hémat., 1949, 4, 481-502

33 - FEULGEN R. & ROSSENBECK H. : Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure... Z. Physiol. Chem., 1924, 135, 203-248

34 - FISHMAN W.H., SPRINGER B. & BRUNETTI R. : Study of human blood β-glucuronidase. J. Biol. Chem., 1948, 173, 449-456

35 - FONIO A. & SCHWENDENER J. : "Die Thrombozyten des menschlichen Blutes", Hans HUBER éd., Berne, 1942

36 - FONIO A. : Neuere Untersuchungen über die Physiologie und Pathologie der Thrombozyten.
IIème Congres Européen d'Hématologie, Cambridge, 1950

37 - FREEMAN G. : Method for obtaining large yields of human platelets as a by-product of blood collection. Science 1951, 114, 527-528

38 - FUJITA A. : Uber den Stoffwechsel der weissen Blutzellen. Klin. Woch. 1928, 7, 897-898

39 - GOHAR A. : Centrifuge tubes for collection of leukocytes. Brit. Med. J., 1943, 1, 542

40 - GRAFFLIN A.L. : Total numbers, individual cell volumes and total cell volumes in normal human blood. Anat. Record., 1941, 81, 119-120

41 - GUTTMANN W. : Die Kernsubstanzen der Blutplättchen. Z. für die Inn. Med.,1947, 2, 362-376

42 - HANAUSEK J. : Méthode pour recueillir de grandes quantités de leucocytes et de plaquettes. C.R. Soc. Biol.,1933, 114, 817-821

43 - HAUROWITZ F. & SLADEK J.: Uber die chemische Zusammensetzung der Blutplättchen. Hoppe-Zeyler's Z. für Phys.Chemie,1928,173,233-234

44 - HAYEM G. : L'Hématoblaste. Presses Univ.,PARIS, 1923

45 - HIRSCH E.O., GARDNER F.H. & THOMAS E.D. : Isolation and concentration of human blood platelets : their properties in vitro and in vivo. J. Clin.Inv.,1952,31, 638-639

46 - HITTMAIR A. : Blutplättchen und Hämokonien, in "Handbuch der allg. Hämatologie", 1932, vol. 1, t. 1, 503-548

46 bis - HITTMAIR A.: Das Blutplättchen im Spiegel des Schriftums der letzten 10 Jahre, Folia haemat.,1938,59, 50-92

47 - HORANYI M. : Investigations into the origin of Thromboplastin, Acta Med. Scand., 1949, 134, 448-453

48 - HORWITZ S. : Neuere Untersuchungen an Blutplättchen. Z. für d. ges. exp. Med., 1930,73, 432-451

49 - HORWITZ S. : Die Blutplättchen in methodischer Hinsicht. Klin. Woch., 1931, 10, 1613-1616

50 - IGLAUER K. & WEBER S. : Die Katalenwirkung der Thrombozyten, Bioch. Z., 1931, 234, 489-495

51 - IYENGAR N.K. : Trypsinkinase in Blood. Proc. Ind. Acad.Sc. (section B),1942,15, 106-111

51 bis - JACOB A. : Décomposition en ses divers constituants du système enzymatique de désaturation des acides gras supérieurs. C.R. Soc. Biol., 1953, 147, 1044-1046

52 - JOLLY J. : Traité technique d'Hématologie. MALOINE, Paris, 1925

53 - JULLIARD J., MAUPIN B., THEILLEUX R., NAU P. & LOVERDO A. : Transfusion au lapin de leucocytes et de plaquettes du sang humain après marquage par le radiophosphore. C.R. Soc. Biol., 1952, 146, 211-214

54 - LEMELAND P. : Recherches sur le dosage des lipoïdes dans le sang et les tissus. Bull.Soc.Chim.Biol., 1923, 5, 110-124

55 - LOEBER J. : Zur Physiologie der Blutplättchen. Pflüger's Arch. f.d.gen.Physiol., 1911, 140, 281-292

56 - LOHNER L. : Uber das spezifische Gewicht der Leukocyten und Thrombozyten. Pflügers'Arch.f.d.gen.Physiol., 1939, 242, 509-513

57 - MACHEBOEUF M. & DELSAL J.L. : Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans les matières organiques. Bull.Soc. Chim.Biol., 1943, 25, 116-120

57 bis - MACHEBOEUF M., REBEYROTTE P., DUBERT J.M. & BRUNERIE M. Micro-électrophorèse sur papier avec évaporation continue du solvant (électrorhéophorèse). Bull.Soc.Chim.Biol. 1953, 35, 334-345

58 - MAUPIN B. & CHARY R. : Présentation d'une nouvelle méthode de séparation des leucocytes et des plaquettes sanguines. Sang, 1952, 23, 336-340

59 - MINOR A.H. & BURNETT L. : A method for separating and concentrating platelets from normal human blood. Blood, 1952, 7, 693-699

60 - MOOLTEN S.E., VROMAN L. et G.W.S., & GOODMAN B. : Role of blood platelets in thrombo-embolism. Arch. Int. Med., 1949, 84, 667-710

61 - NIKOLAEVA N.I. : Thrombocytes as one of the sources of blood enzymes, Byull. Eksp. Biol. Med., 1946, 22, 24

62 - OGUR M. & ROSEN G. : The nucleic acids of plant tissues : I. The extraction and estimation of D.N.A. and P.N.A. Arch. Bioch., 1950, 25, 262-276

63 - OLEF J. : Determination of platelet volume. J. Lab.Clin.Med., 1937, 23, 166-178

64 - ONAKA M. : Uber oxydationen im Blut.
Z. für Physiol. Chem., 1911, 71, 193-199

65 - OWREN P.A. : The Coagulation of Blood.
Acta Med. Scand., 1947, suppl. 194, 327 pages

66 - OWREN P.A. : Le complexe activateur de la prothrombine et son intérêt clinique.
Rev. Hémat., 1951, 6, 135-147

67 - PANIJEL J. : Les problèmes de l'histochimie et la biologie cellulaire. HERMANN éd., Paris 1951

68 - PANTALEON J. : Etude biochimique et physiologique de la cholestérol-estérase et de la lécithase sériques et pancréatiques.
Thèse de Doctorat-ès-Sciences, PARIS 1944

69 - PARROT J.L. & GABE M. : Sur la répartition de l'histamine dans les éléments constitutifs du sang humain.
C.R. Soc. Biol., 1945, 139, 965-967

70 - QUICK A.J., SHANBERGE J.N. & STEFANINI M. : The role of platelets in the coagulation of the blood.
Am. J. Med. Sc., 1949, 217, 198-207

71 - RHEINGOLD J.J. & WISLOCKI G.B. : Histochemical methods applied to Hematology. Blood, 1948, 3, 641-655

72 - ROHR K. & KOLLER F. : Uber die Abstammung der Thrombozyten
Klin. Woch., 1936, 15, 1549-1553

73 - ROLLA A. : Sulla presenza di sostenza nucleare nelle piastrine.
Haematologica, 1935, 16, 619-624

74 - ROSKAN J. : Physiologie normale et pathologique du globulin.
Presses Univ., Paris 1927

75 - ROSKIN G.O. & GRUNBAUM F.T.: Beiträge zur Kenntnis der Blutplättchen, Virchow's Arch. Path.Anat.Physiol.,1926,261, 528-532

75bis - SALTZMAN G.F. : The origin of blood platelets.
Acta Med. Scand., 1948, suppl. 221, 98 pages

76 - SCHNEIDER W.C. : Phosphorus-compounds in animal tissues :
I. Extraction and estimation of D.N.A. and P.N.A.
J.Biol.Chem.,1945, 161, 293-303

77 - SOULIER J.P. & LARRIEU M.J. : Etude analytique des temps de QUICK allongés. Dosages de prothrombine, de proconvertine et de proaccélérine. Sang, 1952, 23, 549-559

78 - STEFANINI M. : Conversion factors and accelerators in the formation of thrombin. Blood, 1951, 6, 84-93

78 bis - STEFANINI M. : Mechanism of blood coagulation in normal and pathological conditions. A.M. J. Med., 1953, 14, 64-86

79 - STORTI E. & STORTI R. : La reazione di FEULGEN in ematologia : Piastrine. Monit. zool. ital., 1935, 46, 71-76

80 - TOCANTINS L.M. : Technical methods for the study of blood platelets. Arch. Path., 1937, 23, 850-879

81 - TOCANTINS L.M. : The mammalian blood platelet in health and disease. Medicine, 1938, 17, 155-258

82 - TULLIS J.L. : Separation and purification of leucocytes and platelets. Blood, 1952, 7, 891-896

82 bis - TULLIS J.L. : Blood cells and blood proteins. Acad. Press. Inc., éd., New-York 1953

83 - TURCHINI J., CASTEL P. & KHAU VAN KIEN L. : Une nouvelle coloration nucléaire : coloration cytologique des noyaux par une fluorone. Montpellier Médical, 1943, 23/24, 440-441

84 - TZANCK A. & BURSTEIN M. : Recherches sur la coagulation sanguine. Rev. Hémat., 1946, 1, 35-44

84 bis - UNDRITZ E. : Planches d'Hématologie. FROBENIUS éd. , Bâle 1950, pp.65-67

85 - VALETTE G., MAUPIN B. & HUIDOBRO H. : Plaquettes sanguines et histaminase. C.R. Soc. Biol., 1951, 145, 313-315

86 - VALLEE B.L., HUGHES W.L. & GIBSON J.G. 2nd : A method for the separation of leukocytes by flotation on serum-albumin. Blood, 1947, special issue I, 82-87

87 - VAN ALLEN G.M. : Volume measurements of blood platelets. J. Lab. Clin. Med., 1926/27, 12, 282-285

87 bis - VAN CREVELD S. & PAULSSEN M.M.P. : Significance of clotting factors in blood platelets in normal and pathological conditions. Lancet 1951, 2, 242-244

88 - VAN OYE E.L. : Note sur les acides nucléiques des plaquettes sanguines. Haematologica, 1948, 31, 689-692

89 - VOIT K. & KEMPA H. : Uber der Nachweis von echter Kernsubstanz in den Thrombozyten. Z. für Biol.,1934, 95, 635-638

90 - VOIT K. : Zur Frage der Kernsubstanz in den Thrombozyten. Aerzt. Forschung, 1948, 2, 13

91 - WAGNER R. : The estimation of glycogen in whole blood and white blood cells. Arch. Biochem. 1946, 11, 249-258

92 - WARBURG O. : Untersuchungen über die Oxydationsprozesse in Zellen. Münch. Med. Woch., 1911, 58, 289-291

93 - WARE A.G., FAHEY J.L. & SEEGERS W.H. : Platelet extracts : fibrin formation and interaction of purified prothrombin and thromboplastin. Am. J. Physiol.,1948, 154, 140-147

94 - WERNER H. : Strukturgebundene Fermentwirkung der Thrombozyten. D. Med. Woch., 1944, 70, 155-157

95 - WISLOCKI G.B., RHEINGOLD J.J. & DEMPSEY E.W. : The occurrence of the per-iodic SCHIFF reaction in various normal cells of blood and connective tissues. Blood, 1949, 4, 562-568

96 - ZAJICEK J. & DATTA N. : Acetylcholine esterase in Thrombocytes of Rat blood. Acta haemat., 1952, 7, 39-43

TABLE DES MATIERES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

AVANT-PROPOS :

Page

A) FAITS CONNUS : autonomie des plaquettes 1
vie et mort des plaquettes 2
morphologie descriptive 2
morphologie comparée 3
physiologie des plaquettes sanguines :
(rôle dans l'hémostase 4
(rôle dans la coagulation proprement dite 5
(rôle dans la rétraction du caillot 8
physiologie comparée 8

B) DONNEES CONTROVERSEES: 9

PREMIERE PARTIE :

CHAPITRE I : METHODES DE SEPARATION DES PLAQUETTES :

A) Rappel des procédés classiques. 12
B) Tendances nouvelles 14
C) Technique personnelle 15

CHAPITRE II : DONNEES PHYSIQUES RELATIVES AUX PLAQUETTES :

A) Données antérieures 18
B) Données originales :

1° numération et contrôle de la pureté des préparations 18
2° relation entre poids frais, poids sec et concentration des plaquettes 21
3° densité des plaquettes 21
4° volume individuel moyen 22

DEUXIEME PARTIE : CHIMIE ET HISTOCHIMIE :

CHAPITRE I : ESSAI D'IDENTIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES PAR LES METHODES HISTOCHIMIQUES ET PAR LA CHIMIE.

Choix d'une méthode 24

Page

1ère section : acide désoxyribonucléique :

A) Données antérieures 25
B) recherches personnelles. . . . . .
(a) étude des plaquettes par la réaction de FEULGEN . . 27
(b) étude des plaquettes par la réaction de TURCHINI 29

2eme section : acide ribonucléique :

A) données antérieures 30
B) recherches personnelles 30

3ème section : Discussion (histochimie) 32

4eme section : recherche des Acides Nucléiques (ou de leurs composants) par l'analyse chimique. 33

A) données antérieures 33
B) recherches personnelles 34

CHAPITRE II : ANALYSE CHIMIQUE DES PLAQUETTES :

1°) Composition minérale des plaquettes :

A) données antérieures 37
B) recherches personnelles 39

2°) Lipides plaquettaires :

A) données antérieures 42
B) recherches personnelles 43

3°) Protides plaquettaires :

A) données antérieures 46
B) recherches personnelles :
(a) dosages d'azote sur le produit brut 46
(b) dosages d'azote sur le lysat plaquettaire et le résidu insoluble 48
(c) étude électrophorétique 50

4°) Autres constituants chimiques 53

Discussion 54

Tableau récapitulatif 55

Page

TROISIEME PARTIE : METABOLISME DES PLAQUETTES

CHAPITRE I : ACTIVITE RESPIRATOIRE DES PLAQUETTES :

A) données antérieures 57
B) recherches personnelles 58

CHAPITRE II : ACTIVITE ENZYMATIQUE DES PLAQUETTES :

A) données antérieures 61
B) recherches personnelles . . . . . :
(systèmes enzymatiques agissant sur les lipides
((désaturase, - lécithase) 62
(essai de mise en évidence d'une activité
(protéasique.... 65

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La plaquette sanguine de l'homme est-elle une cellule vivante ?

I. Rappel des positions prises par les précédents auteurs . 66

II. Apports personnels 67

III. Conclusions 69

Clichés photographiques hors-texte : figures 1 à 7

BIBLIOGRAPHIE . . . . . .pp. 72
à 79

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

D E U X I E M E T H E S E

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Propositions données par la Faculté

THEORIES MODERNES DE LA COAGULATION

Vu et approuvé :

Paris, le 20 juin 1953

Le Doyen de la Faculté des Sciences

A. CHATELET

Vu
et Permis d'imprimer :
Pour le Recteur de l'Académie
de Paris

Le Vice-Président du
Conseil de l'Université

A. CHATELET